

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio sobre las propiedades de los componentes de  
membranas citoplasmáticas obtenibles de micrococcus  
lysodeikticus por diferentes procedimientos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Sarah Franco-Estrugo**

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BIBLIOTECA UCM**



5300128873

**Serie A - n.º 212**

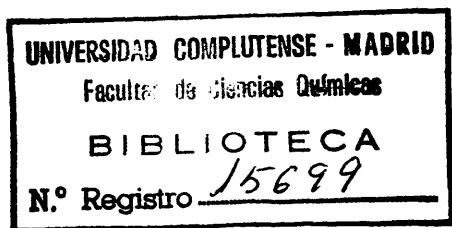
**SECCION DE QUIMICAS**

**«ESTUDIO SOBRE LAS PROPIEDADES DE  
LOS COMPONENTES DE MEMBRANAS  
CITOPLASMATICAS OBTENIBLES  
DE MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS  
POR DIFERENTES PROCEDIMIENTOS»**

**TESIS DOCTORAL**

por

**SARAH FRANCO-ESTRUGO**



**Publicaciones de la Facultad de Ciencias  
MADRID, 1974**



Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Emilio Muñoz Ruíz, Investigador Científico del Instituto de Biología Celular y Jefe de la Sección "Bioquímica de Membranas", por la sugerencia de este tema de trabajo y las valiosas discusiones durante la realización del mismo.

Igualmente agradezco a los Dres. Juan Antonio Leal Ojeda, Concepción García Mendoza y Monique Novaes-Ledieu por su colaboración en la corrección de este manuscrito.

Asimismo, expreso mi reconocimiento al Prof. Dr. Angel Martín Muncio por su amabilidad al revisar este Tesis Doctoral y aceptar ser ponente de la misma.

Agradezco también a la División de Ciencias Médicas Matemáticas y de la Naturaleza del C.S.I.C., por su ayuda financiera.



# INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION .....	9
JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION .....	32
METODOS Y MATERIALES	
A) PARTE EXPERIMENTAL .....	34
M. LYSODEIKTICUS - CONDICIONES DE CULTIVO (167) .....	34
METODO DE OBTENCION DE MEMBRANAS .....	34
SOLUBILIZACION DE MEMBRANAS .....	36
EXTRACCION DE LIPIDOS DE MEMBRANAS DE M. LYSODEIKTICUS .....	37
ELECTROFORESIS .....	41
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS (201) .....	43
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE HIDRATOS DE CARBONO (203) ....	44
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE Fe (208) .....	45
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE ACIDOS NUCLEICOS .....	45
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE LIPIDOS (212) .....	46
DETERMINACION ELECTROFORETICA DE PESOS MOLECULARES .....	47
FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES POR CRIBAS MOLECULARES .....	47
IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE AZUCARES .....	49
REACCIONES DE COLORACION .....	50
- Azúcares reductores .....	50
- Cetoheptosas .....	50
- Hexosaminas (234) .....	50
DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SH .....	51
ESTIMACION DE ACIDOS RIBONUCLEICOS .....	54
ESTIMACION CUANTITATIVA DE RIBOSA .....	55
DETERMINACION DE ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO .....	57
DETERMINACION CUANTITATIVA DE FOSFORO .....	57
DETERMINACION ANALITICA DE OTROS HIDRATOS DE CARBONO .....	58
- Determinación de hexosas (248) .....	58
- Determinación analítica de heptosas (249) .....	59
EXTRACCION DE POLISACARIDOS (254) .....	60

	<u>Página</u>
DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS .....	60
ANALISIS DE ESPECTROS .....	62
B) MATERIALES .....	63
RESULTADOS Y DISCUSION .....	64
SOLUBILIZACION DE MEMBRANA R1. EFECTO DEL pH. EXTRACCION DE LI- PIDOS CON N-BUTANOL. EFECTO DEL pH Y LA IODOACETAMIDA EN LA RE- CUPERACION DE PROTEINAS SOLUBLES. DISTRIBUCION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS DE LA SOLUCION DE MEMBRANA R1 Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS .....	64
DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SH. APLICACION A SE- ROALBUMINA BOVINA, SEROALBUMINA BOVINA REDUCIDA Y A SOLUCION DE MEMBRANA R1 .....	73
EFFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IODOACETAMIDA EN LA SO- LUBILIZACION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS R1 .....	78
A - Migración electroforética y movilidad relativa de proteínas en presencia de distintas concentraciones de iodoacetamida. ....	78
B - Absorción visible y ultravioleta de soluciones de la membra- na R1. Efecto de la presencia de iodoacetamida .....	90
DETERMINACION ELECTROFORETICA Y PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS SOLUBLES PRESENTES EN LA FRACCION S <sub>2</sub> + I DE LA MEMBRANA R1 ....	95
FRACCIONAMIENTO POR CRIBA MOLECULAR DE PROTEINAS Y RNA. APLICA- CION A LA SOLUCION DE MEMBRANA R1 .....	96
ESTIMACION DE RIBOSA, FOSFORO Y HEXOSAS EN LA SOLUCION DE MEM- BRANA R1 EXTRAIDA CON N-BUTANOL. EFECTO DEL pH .....	100
EXTRACCION COMPARATIVA DE ACIDOS RIBONUCLEICOS EN DIFERENTES TI- POS DE MEMBRANAS. DETERMINACION CUANTITATIVA. ANALISIS ESPECTRO- FOTOMETRICO. IDENTIFICACION ELECTROFORETICA .....	110
EXTRACCION COMPARATIVA DE HEXOSAS EN DIFERENTES TIPOS DE MEMBRA- NAS. DETERMINACION CUANTITATIVA Y ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO. ....	116
ESTIMACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS Y LIPIDOS EN DIFERENTES TI- POS DE MEMBRANAS Y DISTRIBUCION ELECTROFORETICA DE LIPIDOS ....	138
IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS, LIPIDOS E HIDRATOS DE CARBONO EN MEMBRANAS TIPO Y EN SUS RESIDUOS CORRESPONDIENTES DESPUES DE LA EXTRACCION CON CLOROFORMO-METANOL. EFECTO DEL MER- CAPTOETANOL .....	140
EXTRACCION DE POLISACARIDOS DE MEMBRANAS RS10 .....	146
CONCLUSIONES .....	149
APENDICE .....	153
BIBLIOGRAFIA .....	159

## INTRODUCCION

Es difícil en nuestros días imaginar la sorpresa y curiosidad despertadas en los primeros investigadores que observaron por primera vez una unidad celular. Hace casi un siglo que la existencia de la membrana celular fue sugerida por de Vries, Pfiffer y Overton (1, 2, 3) estudiando células de plantas.

La realidad física de la membrana no fue sin embargo comprobada hasta los primeros tiempos del uso de la microscopía electrónica, pero su existencia fue en realidad deducida indirectamente por estudios derivados de su función. Es alrededor de 1930 cuando se incrementa el estudio de las membranas celulares, e indudablemente el microscopio electrónico y las nuevas técnicas de manipulación (4) permitieron el descubrimiento de su existencia aun cuando no el entendimiento de su composición.

El resultado de la investigación biológica señala claramente el hecho de que la célula es un sistema complejo de componentes celulares to dos ellos delimitados por un complejo organizado o membrana celular.

En los primeros tiempos del estudio de las membranas se sugirió la posibilidad de que las membranas estaban formadas por moléculas de lípi dos organizados en bicapas, con la parte polar de los mismos dirigida hacia el interior de la misma y la cabeza polar hacia la superficie don de pudiera reaccionar electrostáticamente con las proteínas. Varias modificaciones de esta teoría se presentaron durante los años 1925 a 1970 (5, 6, 7). Los modelos fundamentales se basan principalmente en el hecho de que las mismas contienen una elevada concentración de lípidos (80% en la mielina) (8), pero debieron modificarse al comprender la existencia de otras membranas conteniendo concentraciones menores de lí pidos entre el 30 al 50% (9, 10).

El microscopio electrónico permitió observar no sólo la membrana ce-



lular sino la existencia de membranas intracitoplasmáticas. En efecto, la presencia de estructuras semejantes a la membrana plasmática pudo observarse en cloroplastos, mitocondrias, cuerpos de Golgi, vacuolas y retículo endoplásmico. Surgen entonces teorías para explicar los hallazgos experimentales y métodos para la comprobación de esas teorías en virtud de los componentes encontrados en las membranas.

La aplicación de estas nuevas técnicas, permitió tener una idea más completa de los modelos iniciales. Así, la presencia de proteínas dio lugar a modelos de membranas en las que las proteínas se presentan como componentes fundamentales y de cuyas interacciones se infieren las propiedades fundamentales de la membrana (11). Sin entrar en detalles sobre los argumentos existentes en favor de una u otra teoría, convendría señalar en este punto que las conclusiones alcanzadas por diferentes grupos de investigadores podrían ser una simple consecuencia de la diferente naturaleza de las membranas estudiadas; mielina (7) y mitocondrias (11). Además, debe tenerse en cuenta que según datos recientes (12), los componentes no son estáticos, sino dinámicos, es decir, pueden inducirse cambios locales de estructuras de membrana por agentes como el pH, la fuerza iónica, etc. El uso de anticuerpos específicos de membranas permiten determinar estas modificaciones. Estos experimentos sugieren la necesidad de considerar que los modelos de membrana propuestos deben además tener en cuenta que la estructura de la misma puede variar con el tiempo (13).

Cuando las membranas de diferentes orígenes se extraen con solventes orgánicos como fenol (14); butanol (15); piridina (16); cloroformo-metanol ácido (17); detergentes (18); ácido fórmico (19); ácido acético (20); el análisis de las fracciones solubilizadas indica que sus componentes proteicos son diferentes. Capaldi y Green (21) consideran que las proteínas intrínsecas (22) son las que penetran en el interior de la cadena lipídica con fuerzas predominantes de carácter hidrofóbico y que serán solubilizadas por agentes que compitan con estas fuerzas. Una vez extraídas, serán probablemente insolubles en solventes acuosos en ausencia de detergentes y tendrán tendencia a formar agregados. Las proteínas extrínsecas (21, 22) por el contrario podrán ser extraídas por agentes electrostáticos y serán solubles en medio acuoso. Como diferencia fundamental, las proteínas intrínsecas tendrían la habilidad de

recombinarse con lípidos, y recombinar la membrana; mientras que las proteínas extrínsecas no tendrían esta propiedad.

Las membranas biológicas podrían estar formadas por la organización de sus componentes: proteínas de actividad enzimática, proteínas estructurales o inactivas, fosfolípidos, otros lípidos, azúcares y todos los componentes macromoleculares que se encuentran en las mismas. Todos estos componentes deben estar presentes en un grado de organización del cual son responsables las propiedades de la membrana; transporte, permeabilidad, funciones metabólicas, etc. Este grado de organización debe ser el necesario para mantener las funciones específicas con el mínimo necesario de enzimas específicas y el máximo de rendimiento de las funciones realizadas.

¿Cuál es la topografía de estas estructuras? ¿Cómo estamos seguros de que los métodos empleados en su estudio no introducen modificaciones conformacionales diferentes de las primitivas? En los años recientes, Bretscher (23) ha indicado la posibilidad de marcar proteínas de eritrocitos en forma tal que el compuesto marcado no penetre en el interior de la célula y señala que la membrana es asimétrica. Si por esta técnica se marca la glicoproteína mayoritaria se obtienen resultados que sugieren que ésta se extiende entre las dos caras.

Steck (24), indica que es posible separar de membranas de eritrocitos su capa externa e interna invertida y observa que el ácido siálico y la acetilcolinesterasa se encuentran en la cara externa, mientras que la diaforasa y la glicérido-3-fosfato deshidrogenasa se encuentran en la cara interna.

Branton y Deamer (25) aplican la técnica de cortar membranas de eritrocitos congelados (criocorrosión) y estudiarlos con el microscopio electrónico. En esas condiciones se obtiene el corte por la mitad de la bicapa lipídica. La observación revela la existencia de partículas de 50 a 85 Å de diámetro en el interior de la capa lipídica que son proteínas puesto que no se observan cuando la membrana se trata previamente con proteasas. De los estudios cuantitativos de partículas observadas, y teniendo en cuenta el número de partículas y su densidad, deducen que el 67% de la membrana está cubierta de lípidos y que un 10 a un 20% del volumen interno son proteínas. ¿Qué composición particular tienen estas proteínas que no se disuelven en el medio interno de la célula?

Rosenberg y Guidotti (26) analizaron la composición de aminoácidos de numerosas membranas y observaron que tienen aproximadamente la misma proporción de aminoácidos polares y no polares que las que se encuentran en las proteínas solubles comunes. Spatz y Strittmater (27) sugieren que las proteínas de la membrana tienen la región no polar embebida en la parte de la membrana que contiene la región no polar de las cadenas de los ácidos grasos o de los fosfolípidos, y la región polar expuesta en la superficie de la membrana.

Steck y Fox (28) analizan comparativamente la composición de aminoácidos de diferentes membranas obtenidas por varios autores y concluyen, que en general los restos hidrofóbicos son de un 30 a un 35% de los aminoácidos detectados y, además, la composición en las diferentes membranas es semejante a pesar de las diferentes propiedades macrofísicas de las mismas, y/o los sistemas enzimáticos predominantes en cada una. Si se compara en cambio la composición de aminoácidos en proteínas purificadas de membranas por solubilización con solvente de fuerza iónica específica y la de los resistentes al proceso de solubilización, el aspecto es diferente. Las proteínas solubilizadas tienen una mayor concentración de aminoácidos polares y menor número de residuos hidrofóbicos, que las que son resistentes al método de solubilización. Los autores suponen que la explicación de estos resultados se deben a que las proteínas hidrofílicas estarían en la superficie de la membrana que acarrea las actividades biológicas y que en general se realizan en un medio acuoso. La región hidrofóbica en cambio que penetra en la capa lipídica representa el apéndice por el que estas proteínas están unidas al seno de la membrana.

Los trabajos realizados en membranas de mitocondrias también indican la existencia de proteínas diferenciales en la parte interna y externa de la membrana. Así, por ejemplo, mientras que en la membrana externa (29) se detecta la monoamino oxidasa, la adenosil-trifosfatasa, la acil-coenzima A sintetasa, la palmito coenzima A ligasa, etc., la membrana interna presenta las deshidrogenasas (30) enzimas de la cadena respiratoria (31) y las partículas elementales contienen la adenosin trifosfatasa (32).

La idea de la membrana particulada fue introducida por Sjöstrand en 1963 (33). Green y col. (34) extendieron y amplificaron los argumentos

originales. Así, Capaldi y Green (21), presentan un modelo de membrana en que las proteínas interaccionan a lo ancho de la bicapa de lípidos e interaccionando entre sí con glicoproteínas extendidas transversalmente, las proteínas intrínsecas y extrínsecas delimitadas en el interior o exterior del modelo, dejan canales que permiten el pasaje de solutos. El modelo es similar al presentado por Singer y col. (22, 35, 36) en que las glicoproteínas se extienden a través de la bicapa de lípidos, pero las proteínas aunque sumergidas en la misma no interaccionan entre sí sino con la sección no polar de los lípidos.

Otra evidencia en favor de este tipo de estructura y diferente del modelo de Danielli-Davson (6) proviene de la evidencia suministrada por Fernández Morán y col. (37) que observaron estructuras protuberantes en la membrana interna de la mitocondria. Kagawa y Racker (38) señalan que estas partículas contienen principalmente adenosil trifosfatasa, son solubles y no contienen lípidos.

Green y Perdue (39), propusieron entonces una unidad tripartita conteniendo un grupo de cabeza, un tronco y una base; suponiendo en aquel entonces que el espesor de la membrana sería el de la repetición de estas unidades. Los trabajos de Lenard y Singer (40) y Wallach y Gordon (41), utilizando técnicas de resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja aplicadas a la membrana, sugieren que la presencia de interacciones hidrofóbicas se debe a polipéptidos a través de la porción de  $\alpha$  hélices y los lípidos, ya que las proteínas dejan poros centrales mientras que los lípidos forman cilindros entre las unidades de la subunidad proteica. La permeabilidad de estos canales estaría en función de los cambios conformacionales de estas proteínas.

Fessenden-Roden y Racker (42), en un estudio reciente en el que analizan todos los componentes encontrados en la membrana de mitocondrias, sugieren que los factores de acoplamiento de la cadena respiratoria y la succínico deshidrogenasa se encuentran en la matriz de la membrana, mientras que el citocromo se encuentra en el otro extremo y las partículas conteniendo la ATPasa se encuentran en la matriz como unidades protuberantes.

Por otra parte Sjöstrand (43) haciendo un estudio de modelos de acoplamiento de los componentes de la cadena respiratoria sugiere la formación de complejos multimoleculares de proteínas globulares o lipoproteí

nas con un perfil irregular en que los lípidos se distribuyen en forma ininterrumpida entre los multicomplejos enzimáticos. El resultado de ésos casos es un alto grado de eficiencia de las enzimas constituyentes de estos multicomplejos. Como no existe una unidad repetitiva del multicomplejo, los poros existentes pueden ser negativos (dominancia de grupos carboxílicos) o positivos (dominancia de grupos amino) favoreciendo con ello la captura de aniones o cationes; la absorción de macromoléculas incluye una primera etapa de adsorción de la molécula a la superficie de la membrana y una segunda etapa en que la transformación alostérica inducida por la primera etapa provoca el desplazamiento de la partícula hacia la fase interior de la membrana. Cabe destacar, que la posibilidad de formar complejos de los componentes solubizados de la membrana ha sido repetida por diferentes laboratorios (entre otros, 44, 45, 46, 47) y que el posible cambio conformacional de proteínas mitocondriales ha sido estudiado con compuestos fluorescentes (48) con los cuales se observaron cambios morfológicos en el microscopio electrónico en membranas mitocondriales en diferentes estados y actividad.

Es indudable que entre los últimos modelos presentados la complejidad de asociaciones posibles de macromoléculas del modelo de Sjöstrand presenta una posible diferenciación de membranas respecto de las soluciones individuales. Es así como en la década actual se inicia un periodo de búsqueda de diferentes componentes en diferentes membranas, contradiciendo los esfuerzos de la década pasada de encontrar una "unidad estructural" o "proteínas estructurales" como factor común denominador de todas las membranas (49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 entre otros).

Trabajos recientes de Dreyer y col. (57), parecen indicar que la existencia de estas proteínas estructurales es innecesaria, y estaría en contradicción con la necesaria economía estructural de las membranas. Más aún, las proteínas aisladas de cada membrana (mitocondria, eritrocitos, retículo sarcoplasmático, segmentos de retina) parecen ser específicamente derivados de las funciones particulares de estas membranas.

Wallach (58), en cambio, parece no darle mucha importancia al hecho de que las proteínas o péptidos encontrados en membranas de eritrocitos tengan grandes variaciones de tamaño, fracciones de P.M. de 30.000 a 150.000). Dice que unidades diferentes pueden asociarse para formar las unidades idénticas que se suponen existentes en los modelos hexagonales

de membranas particuladas. También sugiere que esta identidad pueda ser función de cambios conformacionales de los componentes que resultan entonces dando una estructura ordenada, aún cuando las unidades no resulten idénticas. Es decir, supone que en lugar de la existencia de unidades homólogas, los componentes de la membrana pueden formar asociaciones equivalentes. El autor analiza los cambios conformacionales observados en el espectro infrarrojo de mitocondrias y eritrocitos durante procesos biológicos (59, 60), aplicando el tratamiento teórico de Changeux y colaboradores (61, 62, 63, 64) para los cambios alostéricos de polímeros. Los estudios de Changeux y col., se basan en la suposición de que existe un equilibrio entre las formas alostéricas posibles en ausencia de un ligando, pero que un mínimo cambio introducido por un estímulo externo puede traer grandes cambios conformacionales. La aplicación de ecuaciones deducidas por estos autores para los cambios de energía libre de las transiciones de uno a otro estado permiten la deducción de un factor operativo  $\Delta$  al que pueden darse dos valores; cuando  $\Delta$  es igual a 1, no existen cambios cooperativos, y cuando es pequeño, estos efectos aumentan. Si  $\Delta$  es muy pequeño, el sistema se considera metaestable, es decir, pequeños cambios de concentración de un ligando, y su unión a pocas moléculas pueden perturbar toda la membrana. Para que esto ocurra, Changeux y col., consideran que estas macromoléculas deben formar parte de una capa con asociaciones equivalentes entre vecinos. Wallach considera que la arquitectura molecular de las membranas de eritrocitos y mitocondrias cambian también en función de asociaciones con ligandos adecuados. En mitocondrias, la conformación antiparalela  $\beta$  aumenta considerablemente cuando aumenta la velocidad del transporte de electrones, y disminuye cuando ésta se acopla a la fosforilación oxidativa. En la misma forma, los eritrocitos en "reposo" no poseen estructura  $\beta$ , pero esta conformación es dominante cuando la ATPasa se activa por la acción del sodio o el potasio. No se sabe si este cambio de conformación obedece a cambios locales de pH o del campo eléctrico, o representan transformaciones cooperativas. Sin embargo, y dadas las características de los componentes de la membrana, es posible suponer que pequeños cambios entre las moléculas de sus componentes se propagaran a grandes distancias teniendo en cuenta que en las mismas el efecto cooperativo es muy grande. Las ecuaciones deducidas por Changeux y col. só-

lo pueden aplicarse a las membranas cuando la subunidad funcional se considera parte componente de la capa con asociaciones equivalentes entre vecinos, y no, si se la considera distribuida en secciones localizadas y pequeñas de oligómeros. Wallach analiza los cambios que ocurren en membranas de eritrocitos por efecto de aumentar la concentración de alcohol benzílico. A bajas concentraciones del mismo, se aumenta la estabilidad de la membrana, y a altas concentraciones se induce lisis. Si los cambios introducidos se estudian a través de los cambios de resonancia magnética, (para los protones de bencilo) se observa primero un descenso progresivo del espectro, y para cierta concentración, lisis de la membrana. Esta observación parece apoyar la teoría de Changeaux y col.

Sin embargo, cabe destacar que el modelo empleado en estas consideraciones se basa en la existencia de sólo dos estados conformacionales. Koshland, en cambio, (65) sugiere un modelo múltiple de tautomerización en los que la interacción de un ligando introduce cambios conformacionales en la unidad particular y que la distorsión de esta unidad se transmite con grado de eficiencia variable a las subunidades vecinas.

Más aún Weber (66) estudia las asociaciones de proteínas con ligandos (microasociaciones), tautomerizaciones de la cadena peptídica (cambios conformacionales) y las interacciones entre las cadenas peptídicas (macroasociaciones) considerando cambios energéticos entre las formas posibles, y llega así a la conclusión de que la asociación del ligando no siempre se acompaña con cambios estructurales sino que son el resultado de variaciones de energía libre del sistema que no tiene una relación unívoca con el cambio estructural y, en general, puede ser modificado por una variedad de circunstancias locales.

Podríamos llegar así a la conclusión de que las interpretaciones de modelos de membrana estudiados son entonces representantes de los tipos específicos de membrana y de los tratamientos empleados para su estudio.

Es posible que un mejor conocimiento de los componentes de cada tipo de membrana pueda contribuir a un mejor entendimiento de su morfología y funcionamiento. Más aún, no sólo el detallado conocimiento de los componentes es importante, sino que también es necesario saber cómo se comportan los componentes en las condiciones experimentales de su estudio. Por ejemplo, considerando las técnicas de microscopía electrónica utili

zadas para el estudio morfológico de las membranas, cabe preguntarse qué factores intervienen para dar en cada caso las fotografías observables. ¿Se modifican o no los componentes de las membranas en el proceso preparativo de su visualización óptica? ¿Cuáles son las reacciones químicas responsables?

Algunas de estas preguntas han sido ya contestadas por varios autores. Luzatti (67) indica que las operaciones aplicadas (fijación, deshidratación, inclusión y congelación) muy probablemente exponen a los lípidos a transiciones polimórficas. Sjöstrand (43) hace hincapié en las transformaciones que pueden sufrir las proteínas globulares durante los métodos normales de deshidratación empleados para su observación microscópica. Dice que estos procesos son responsables de una transición de las proteínas de  $\alpha$  hélice a proteínas desnaturalizadas, con los grupos polares dirigidos hacia la superficie de la membrana, mientras que las secciones no polares quedan probablemente orientadas hacia el interior después de la fijación, la zona interior se verá como una zona no coloreada y continua con la apariencia de la capa trilaminar normalmente observada en la microscopía electrónica.

Branton (68, 69) aplica el método de criocorrosión para la observación de membranas. En el mismo, emplea la deshidratación rápida por sublimación del hielo formado al enfriar los cortes. Los cortes de fractura observados corresponden a la zona central de la membrana donde predominan los enlaces hidrofóbicos. El autor concluye que los enlaces considerados son predominantemente los de las largas cadenas alifáticas de los lípidos de la membrana. La interpretación de los resultados obtenidos por Branton y otros autores (25) llevan a la conclusión de que las membranas pueden considerarse como un conjunto asimétrico de proteínas cubiertas por una bicapa lipídica dentro de la cual estarían intercalados los complejos proteicos funcionales.

Packer (70) aplica el mismo procedimiento anterior y dice que las regiones de bicapa en la membrana observada se extienden al menos por 400 Å considerando que los ácidos grasos de mitocondrias varían en cadenas hidrocarbonadas de 16 a 22 átomos de carbono las distancias observables serían de 19 a 27 Å respectivamente. Packer sugiere la posibilidad de que las cadenas cortas estén en la región en que las proteínas penetran más pronunciadamente hacia el interior de la membrana. Cuando el autor



aplica el método de criocorrosión en membranas deshidratadas en sacarosa 2M (que inhibe la transferencia electrónica) observa que el número de partículas disminuye notablemente en la sección cóncava del corte (en el que se observan un número mayor de partículas no agregadas) que en el corte convexo. Observa, además, que cuando se estudian membranas tratadas con solventes orgánicos para extraer los lípidos en forma graduada, la morfología observada es la de un agregado desorganizado de partículas lo que sugiere que los lípidos tienen un papel primordial al establecer las condiciones necesarias para la dispersión de los componentes particulados de la membrana.

Sin considerar las posibles transformaciones de las proteínas como efecto de los agentes empleados, y basándose en las modificaciones observadas en las partículas, cuando se alimentan ratas con dietas deficientes en ácidos grasos no saturados, concluye que en la membrana interna de las mitocondrias los lípidos poseen una estructura cristalina en la que las proteínas internas están en un estado dinámico con posibles cambios de orientación. Los cambios de orientación se deben por ejemplo a variaciones de las fuerzas hidrofóbicas de sus componentes. Una pequeña modificación en el grado de deshidrogenación de los lípidos que lo componen, o el efecto de otros agentes que, como el calcio por ejemplo, al estabilizar la estructura fosfolipídica reduciría la movilidad de las proteínas presentes en la sección hidrofóbica de la misma.

Sin entrar a discutir sobre el mecanismo de síntesis de proteínas, se sabe que la síntesis de proteínas de la célula se realiza en los ribosomas. Este mecanismo de síntesis puede reproducirse in vitro por combinaciones de los ribosomas con fracciones solubles obtenidas por métodos de fraccionamiento de los componentes celulares (71, 72, 73, 74).

Los ribosomas de las células eucarióticas se conocen en dos estados morfológicos distinguibles: en el citoplasma como partículas libres, o asociadas con el retículo endoplasmático. Estructuras de membrana con ribosomas asociados (retículo endoplasmático rugoso) fueron observados por Palade (75). Parte de estas partículas pueden ser extraídas de la membrana por concentraciones de etilendiamintetracetato disódico (EDTA) suficientes para complejar los iones divalentes de la membrana, además de disociar los polisomas en 2 unidades (76, 77). Los resultados de este tratamiento indican que quedan en las membranas un 50% de ribosomas

constituidos principalmente por unidades de 50 S. Estos ribosomas son también resistentes a tratamientos de membrana con puromicina o con ribonucleasa (78). Como los poliribosomas se mantienen unidos por ácido ribonucleico mensajero y éste es sensible a la acción de la puromicina y el EDTA, aún cuando el ácido ribonucleico mensajero (m-RNA) de la membrana no lo es, Rosbash y Penman (78) sugieren que éste es un ácido ribonucleico mensajero particular, o que siendo igual al ácido ribonucleico mensajero celular está unido a la membrana en alguna forma particular.

Palat y col. (79), estudiando membranas endoplasmáticas de embriones de pollo, indican que además de encontrar los ácidos ribonucleicos similares a los del citoplasma aparece un ácido ribonucleico de características diferentes con una constante de sedimentación de 8 a 9 S y una actividad isotópica específica muy elevada y que podría estar implicado en los sistemas biosintéticos de la membrana.

Cualquiera que sea la naturaleza de los ácidos ribonucleicos presentes en la membrana, los estudios bioquímicos sugieren que estos ácidos intervienen en la síntesis de proteínas específicas. Así, por ejemplo, en el hígado de rata la albúmina se sintetiza principalmente en los poliribosomas asociados a la membrana, mientras que la ferridina es producida principalmente por los poliribosomas libres (80, 81, 82). Se ha sugerido que los ribosomas de la membrana están implicados en la síntesis de proteínas de protección, pero no se descarta que algunas de las proteínas de la membrana se sinteticen también en la misma (83).

También se ha sugerido la presencia de un ácido ribonucleico de transferencia (t-RNA) en membranas de embrión de pollo que pudiera tener una función reguladora en la síntesis de hemoglobina, (84). La bibliografía de los últimos años permite suponer la existencia de sistemas existentes responsables de la síntesis de proteínas (ribosomas, poliribosomas t-RNA, m-RNA) que pueden asociarse con las membranas por uniones sensibles a la fuerza iónica y su asociación dependerá de los métodos empleados para su obtención (85).

Puesto que la disposición estructural de las proteínas en la membrana parece ser tan organizada ¿Qué factores son responsables de que las proteínas que se sintetizan, permanezcan o migren a su posición correspondiente?

Singer (36) sugiera la posibilidad de que existan lugares específicos de unión en forma que las proteínas de la membrana sintetizadas se asocien con las membranas a las que corresponden. Por este mecanismo las síntesis de la misma proteína se observarían al mismo tiempo en toda la membrana, y las diversas proteínas se formarían así en diferentes tiempos y a medida de que los ácidos ribonucleicos mensajeros apropiados fueran capaces de dirigir esa síntesis. Aún cuando no se sepa el mecanismo de síntesis de los componentes de la membrana, se sabe por el trabajo de los últimos cinco años el mecanismo de síntesis de algunas glicoproteínas que se excretan. Se sintetizan por procesos en los que interviene el retículo endoplásmico (86, 87). Se sabe así que los residuos de azúcares se agregan después de formada la cadena polipeptídica y que esto se realiza en el aparato de Golgi o en la membrana del retículo endoplásmico o tal vez en ambos lugares, en procesos mediados por las glicosil-transferasas específicas. Así, por ejemplo, glicosil-transferasas de membranas submaxilares de oveja catalizan la adición de disacáridos a unidades de serina y treonina de residuos exógenos de mucina submaxilar bovina y ovina en las que los disacáridos son previamente extraídos por la acción de la neuraminidasa (88, 89). Así, pues, cuando se presume que la membrana tiene un papel fundamental en la síntesis de ciertas proteínas no se conoce cual es concretamente este papel (90,91).

Vemos así que dentro de los conocimientos sobre membranas celulares los hallazgos iniciales sobre los componentes lipídicos al hacerse extensivos a los conocimientos de las proteínas constituyentes y de síntesis, aumentan la complejidad del entendimiento de la relación entre estructura y función. El análisis de las subunidades de proteínas de membrana de hígado, riñón y eritrocitos, de mitocondrias del hígado y del riñón, y retículo endoplasmático del hígado, (92) indica que cada membrana contiene un espectro de proteína particular, y algunas fracciones comunes probablemente originadas de la presencia de funciones comunes. Por ejemplo, mitocondrias del hígado y del riñón tienen solamente ocho subunidades diferentes de las 43 bandas observables en electroforesis. Las bandas de retículo endoplasmático mitocondrias y membrana plasmática parecen por el contrario ser diferentes en su mayoría.

La complejidad en el estudio de las membranas celulares animales o vegetales requiere métodos de fraccionamiento específicos (excepto en

eritrocitos) de acuerdo a su origen, y separación en fracciones para asegurar la pureza de la membrana a estudiar. Para obviar este problema se plantea la conveniencia de estudiar las membranas bacterianas. Las bacterias carecen en general de los diferentes niveles de organización celular (mitocondrias, aparato de Golgi, membrana nuclear, retículo endoplásmico, etc.), pero son capaces de realizar todas las funciones que en los organismos superiores son desarrolladas por esas partículas. Todas las funciones de permeabilidad, transporte de electrones, fosforilación oxidativa, división nuclear, síntesis de componentes de la pared, secreción de proteínas extracelulares, entre otras, se realizan por dos membranas únicamente diferenciadas (93), plasmática y mesosomal.

Los estudios de los componentes enzimáticos en bacterias tienen la facilidad de poder reproducir condiciones de crecimiento que permiten obtener concentraciones de material a estudiar en cantidades adecuadas. El estudio de membranas bacterianas se hace aún más atrayente ya que, careciendo éstas de los diferentes niveles de organización de las células animales, se simplifica su sistema de purificación. Puesto que todas las funciones realizadas por los múltiples orgánulos de las células superiores se realizan en las bacterias por solamente dos membranas, se facilitan los rigurosos criterios necesarios para su purificación. Más aún, un sistema equivalente al retículo endoplásmico con sitios de unión para ribosomas ha sido descrito para membranas de *Bacillus cereus* (94) y *B. megaterium* (95), semejantes a membranas microsomales de células animales.

Desde los primeros estudios microscópicos de las bacterias se observó que éstas poseían una forma rígida impuesta por lo que se llamó pared celular. El estudio de la pared celular fue intensificado en los últimos 10 a 15 años al observarse que algunos componentes de las paredes celulares son responsables de la virulencia de ciertas bacterias. Además, la observación de que algunos antibióticos, como la penicilina, que son capaces de permitir la reproducción de bacterias desprovistas de su pared celular (protoplastos) dio un nuevo empuje a la posibilidad de estudiar las propiedades de la membrana sin las complicaciones de las posibles impurezas introducidas en los métodos utilizados para separar la pared.

¿Cuáles son las dificultades con que nos encontramos al extraer las

membranas bacterianas: La autonomía característica de las bacterias Gram+ o Gram- indica una diferencia fundamental (96). Las bacterias Gram+ están envueltas en una pared celular de 200 a 600 Å, debajo de la cual se observa la membrana bacteriana similar en su aspecto morfológico a las membranas celulares.

En las bacterias Gram- por el contrario, el aspecto observado en el microscopio electrónico es mucho más complicado. Así, por ejemplo, puede observarse la existencia de una membrana externa formada por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas, una capa rígida de peptidoglicanos y una membrana plasmática. En general, se aplica el término de "envoltura celular" que incluye la membrana externa y la capa rígida del peptidoglicano (98, 99). A esta organización se suma en algunas bacterias capsulares una gruesa capa exterior a la membrana externa. La composición química de la envoltura celular ha sido extensivamente estudiada en *Escherichia coli* (100, 101, 99). La superficie exterior está formada por lipopolisacáridos, proteínas y lípidos; la estructura rígida, es de peptidoglicanos unidos covalentemente a lipoproteínas (102) y la membrana citoplasmática está también formada por lipoproteínas. Esta membrana externa puede ser rota por acción de soluciones conteniendo EDTA, liberándose los complejos lipopolisacáridos a la vez que ciertas enzimas periplásmicas (103).

Cuando esto ocurre se transforman a las bacterias de resistentes a sensibles a la acción bactericida de ciertas moléculas hidrofóbicas como la actinomicina D que en la bacteria intacta no ejerce ninguna acción. Esta membrana exterior podría tener la doble función de retener ciertas enzimas esenciales a la vez que proveer a la bacteria de una barrera protectora para evitar la entrada de ciertos tóxicos. Aún cuando no se sabe con seguridad la forma en que estas enzimas periplásmicas se encuentran entre las membranas internas y externas, sí parece confirmarse su ausencia en el interior de la célula bacteriana. La lista de enzimas liberadas en estas condiciones incluye, entre otras, fosfatasas alcalinas, 5-nucleotidasas, fosfodiesterasa cíclica, ribonucleasa, penicilasa, DNA endonucleasa, y enzimas capaces de unir aminoácidos a su pared (104). Se destaca particularmente el hecho de que es posible mantener viables las células de *E. coli* que han perdido del 91 al 92% de sus enzimas periplásmicas (105).

Aún cuando el tratamiento con EDTA libera el complejo lipopolisacárido exterior y las enzimas periplásmicas, el porcentaje liberado depende de la especie estudiada y rara vez representa más de un 30% del total determinado (106).

Surgen así diferentes métodos para separar esta membrana exterior, entre los cuales el más efectivo parece ser el que induce la lisis de la célula bacteriana después de la acción de soluciones conteniendo EDTA y lisozima (107). En este caso se observa la presencia de esferoplastos similares a los que se obtienen con células Gram<sup>+</sup>, que aún presentan secciones de la membrana exterior unidas a los protoplastos. Membranas exteriores fueron obtenidas de *E. coli* de esta forma en presencia de  $Mg^{2+}$  después de lavar esferoplastos con Triton X-100 (108 y 109). En estas condiciones se solubiliza la membrana interna y la membrana externa forma vesículas.

La observación al ultramicroscopio de las membranas teñidas negativamente indican la existencia de una estructura trilaminar. La composición química es de un 45% de proteínas y un 55% de polisacáridos en los que se destaca la presencia de heptosa, glucosa, 7-ceto-3-deoxioctonatos y fosfatos.

El estudio electroforético de sus proteínas indica que pueden extraerse aproximadamente 10 o más bandas con una variación de pesos moleculares de 10.500 a 44.000. Algunas de estas bandas pueden modificarse por calentamiento de la muestra, y aun aumentarse, si las vesículas obtenidas se tratan con pronosa, con penicilina, sacarosa y prolina (110) o rompiendo las células con teflón, por ejemplo. A veces se obtienen membranas ricas en ribosomas y con una concentración elevada de ácidos nucleicos, así como de otras enzimas, y capaces de ser activas en la síntesis del DNA y, posiblemente, de proteínas. También en los Gram<sup>+</sup> como *B. subtilis* (111) se observa la presencia de polimerasa endonucleosas y ligasas en la membrana exterior. Bell y col. (112) indican además la presencia de enzimas degradativas de fosfolípidos en la membrana exterior de *E. coli*.

En realidad, el problema para el estudio de las membranas bacterianas en las bacterias Gram<sup>-</sup>, se dificulta específicamente por la imposibilidad de separar completamente la membrana externa, pero la posibilidad de que ciertos componentes estudiados tengan una ubicación específi

ca (adenosin trifosfatasa, deshidrogenasas, citocromos como componentes de la membrana interna, así como, heptosas de los lipopolisacáridos y ácido murámico de los peptidoglicanos) permitirá un mejor criterio para la purificación de la fracción a estudiar como paso previo al entendimiento de su organización.

Las bacterias Gram+ poseen una estructura más fácilmente definida. La pared celular mide de 200 a 400 Å y puede no tener subestructura. En algunos casos parece hacer contacto próximo entre la sección interna de la pared y la sección externa de la membrana plasmática y, a veces, es posible observar la presencia de mesosomas en regiones específicas (96). La presencia de vesículas periféricas a la membrana sugerida por Gosh y col. (113) no indica que sean semejantes a las observadas en las bacterias Gram-, pues no se liberan enzimas por tratamiento con EDTA y choque osmótico.

Un componente característico, localizado entre la pared y las membranas de estas bacterias, son los ácidos teicoicos, algunos autores (114) sugieren la presencia de ácidos teicoicos intra celulares tal vez asociados con la membrana plasmática. El método general de preparación de membranas de bacterias Gram-, se basa en el uso de enzimas capaces de lisar la pared y en la presencia de estabilizadores osmóticos (115,116). Se diluye luego el medio para producir la rotura celular y obtener la membrana plasmática.

Es indudable la sencillez y fácil obtención de membranas, pero surge una complicación como consecuencia de que estas bacterias presentan vesículas intracelulares o mesosomas de morfología diferentes (113, 117, 118, 119) cuya presencia puede controlarse por condiciones fisiológicas, genéticas, etc. La estructura de los mesosomas fue inicialmente investigada por Chapmann y Hillier (120) y su composición incluye proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (121, 122, 123). En una reciente revisión de los métodos de obtención y de su composición y funciones Reuch y Burger (124) sugieren que pueden ser corpúsculos degradativos y que, en algunos casos, pueden además ser el punto de unión de los nucleótidos a la membrana. En algunos organismos los mesosomas pueden estar vinculados a la síntesis nuclear y tal vez de enzimas extracelulares. También se ha sugerido que los mesosomas sean el sitio de acumulación de los monofosfonucleótidos inicialmente incorporados en la membrana, como purina nu-

cleósidos, adenina o inosina (125, 126).

Las membranas plasmáticas de bacterias observadas al microscopio electrónico se asemejan a la unidad de membrana de Robertson (7) con un espesor de 75 a 85 Å. Las críticas antes mencionadas para otras membranas celulares no permiten ninguna conclusión sobre la arquitectura molecular de las mismas.

Cuando las preparaciones se observan con el método de tinción negativa es posible detectar la presencia de partículas semejantes a las observadas en la membrana mitocondrial interna. En algunos casos se encuentran en ambas caras de la membrana de las bacterias Gram+. Sin embargo, no ha sido posible observar la presencia de una organización interna similar al retículo endoplásmico, aún cuando no se descarta su posible existencia (127). La aplicación de los métodos microscópicos a membranas Gram- (*E. coli* 128, 129), indican la presencia de partículas de 50 a 100 Å de diámetro en la cara externa de la membrana y en mucho menor número en la cara interna cuya función es aún desconocida, pero puede tratarse de complejos enzimáticos.

Si bien la observación microscópica en las membranas plasmáticas bacterianas no indica la presencia de un retículo endoplásmico en algunas bacterias, como *B. cereus* y *B. Megaterium* (94, 130) existe evidencia de que los poliribosomas se unen a puntos específicos de la membrana, que en el *B. cereus* tiene un espesor de conexión de 25 Å. Este material de conexión no es sensible a la acción de la ribonucleasa o la deoxiribonucleasa en *B. Megaterium*. Además, cuando la obtención de membranas se hace en presencia de 20 mM de  $Mg^{2+}$ , el 60% de los ribosomas de la célula continúan unidos a la membrana.

La composición química de las membranas es esencialmente lipoproteica y semejante a las de otras membranas celulares. En general, los resultados representan los valores de la membrana plasmática y mesosomal pues no existen métodos suficientemente específicos que garanticen el fraccionamiento diferencial de las mismas. En las membranas Gram- el problema se complica por los métodos empleados, excepto en las membranas aisladas de micoplasmas que carecen de membrana exterior (131).

Estudios con rayos X de membranas aisladas de *Mycoplasma Laidlawii* (131) indica, que los lípidos tienen una organización de bicapa y las proteínas no se encuentran localizadas en forma uniforme en ningún lado



de la bicapa ni penetrando en ella. Cuando se aplican técnicas de resonancia magnética electrónica a membranas en las que se ha incorporado ácidos grasos marcados, se observa que la mayor parte de los lípidos se encuentran en un medio viscoso de hidrocarburos. La observación ultramicroscópica de preparados crioscópicos indica la presencia de una gran superficie lisa en un 80% (punto de rotura de cadenas metilénicas de fosfolípidos) y partículas en menos de un 20% de su superficie (131).

Estudios del espectro infrarrojo de membranas de *M. Lysodeikticus* (133) que contienen de un 25-30% de lípidos indican que estas membranas son semejantes a membranas de eritrocitos (134) y retículo endoplasmático (135). Las proteínas aparecen como  $\alpha$  hélices con transiciones a conformaciones  $\beta$  al extraerse los lípidos con deoxicolato. Estas transiciones no se observan si la extracción de lípidos se hace con cloroformo-metanol o acetona-metanol. Los lípidos se encuentran en una conformación trans, que favorece la interacción entre cadenas lipídicas. Este carácter disminuye cuando se intenta reconstruir las membranas por la asociación de los lípidos y las proteínas previamente separadas. La presencia de proteínas interaccionando a través de sus cadenas hidrofóbicas con las cadenas de hidrocarburos de los lípidos, parece prevenir la máxima asociación de lípidos en forma más ordenada (trans) que es energéticamente la más estable.

Estudios de difracción con rayos X en membranas de una mutante de *E. coli* (136) indican que la sección polar de los lípidos de la membrana se encuentra en un estado líquido expandido. En este caso es posible observar transiciones de una forma hexagonal compacta a otra expandida o fluida por efecto de la temperatura. Estas transiciones pueden correlacionarse con modificaciones de estados relacionadas con funciones específicas de la membrana. El estudio correlativo de dos actividades enzimáticas (incorporación de prolina y actividad de la sucrosa de deshidrogenasa), modificadas en función de la composición de lípidos y de la temperatura, indica un diferente comportamiento para ambas enzimas.

En base a estas diferencias se sugiere que la organización molecular de la membrana es heterogénea; es decir, cada proteína puede estar asociada con lípidos específicos cuya naturaleza depende de la función que la proteína deba realizar. Similares observaciones en los mecanismos de transporte de azúcares (137) indican que las enzimas involucradas se en

cuentran también en las regiones más móviles de la membrana. Estas observaciones complementan la idea de que la heterogeneidad en la distribución de los componentes presentes en la membrana es la expresión más adecuada para sus múltiples funciones.

La composición de las membranas estudiadas indica que en muchas bacterias la relación de proteínas a lípidos es similar a la presente en eritrocitos. Una revisión de los componentes indica una concentración variable de ácido ribonucleico que en membranas obtenidas en ausencia de  $Mg^{2+}$  es del 1 al 2%. El ácido deoxiribonucleico se encuentra también presente en las membranas pero, en general, se destruye al emplear la deoxiribonucleasa en el proceso de obtención de las mismas. El contenido de hidratos de carbono es variable y, en general, bajo, sugiriendo la posibilidad de que las membranas no poseen polisacáridos o peptidoglicanos. La presencia de lipopolisacáridos en las bacterias Gram- es considerada como un serio contaminante de las membranas cuya purificación es considerablemente difícil.

La composición de los lípidos estudiados en las membranas bacterianas indica en algunos casos una concentración predominante de lípidos de cadenas de hidrocarburos saturadas, ramificadas o de cadenas lineales no saturadas cuya composición puede ser modificada de acuerdo al modo de cultivo (138, 139). Componentes "lípidos solubles" (140) (carotenos, menaquinonas, ubiquinonas, benzoquinonas) se encuentran como componentes de la base lipídica o como constituyentes de la cadena respiratoria o de transferencia de electrones en fragmentos de membranas o fracciones intracelulares. Los carotenos de *M. lysodeikticus* parecen localizarse en la capa lipídica y pueden utilizarse como índice lipídico durante el proceso de purificación de membranas. Otros componentes como poliprenoles se encuentran asociados a mesosomas o a la membrana externa de la célula (141, entre otros). Los esteroides son, en general, raros en las bacterias (142), excepto en especies de *Mycoplasma* crecido en presencia de suero. Los fosfolípidos también se encuentran en las membranas y su composición parece ser específica de la especie, aun cuando sólo se haya determinado la presencia de fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina (138, 139, 143). También se han aislado derivados de glicolípidos en bacterias Gram+ a los que se ha atribuido la posibilidad de formar poros en sus membranas que permiten el paso de cationes,

aniones o ciertos metabolitos solubles en agua (144).

El estudio de las proteínas de membranas bacterianas es incipiente y complejo por los problemas inherentes de la obtención de las mismas, y de los solventes empleados para su separación y solubilización. Moldow y col. (145), solubilizan el 80% de la envoltura del *E. coli* con tiocianato de guanidina. El 40% de las proteínas solubilizadas se mantienen aún solubles en urea 6M y el análisis electroforético indica la presencia de 18 bandas; posterior fraccionamiento en columnas de celulosa, permite purificar algunas bandas cuya pureza se comprueba con el uso de antisueros específicos. Los resultados observados por estos autores indican la ausencia de una concentración mayoritaria de una proteína única o proteína estructural.

Membranas de micoplasma: fueron también solubilizadas con soluciones de SDS 20 mM y tampoco se observa la presencia de una proteína mayoritaria (146). Patterson y Lennarz (147) indican en cambio la presencia de un 90% de una proteína mayoritaria en un bacilo aislado de un cultivo de *B. Megaterium* KM. Salton y col. (148) indican que es posible observar electroforéticamente de 15 a 20 bandas en soluciones de membranas de *M. Lysodeikticus* sin notar tampoco la presencia de una proteína mayoritaria. Osborn y col. (149) solubilizan proteínas de la membrana externa e interna de *S. Typhimurium*. La membrana externa contiene un 60% de proteína, 50% de fosfolípidos y 90% de los lipopolisacáridos de la envoltura bacteriana; esta membrana difiere en la composición de proteínas y de enzimas respecto de la membrana interna. La citocromooxidasa, succínico deshidrogenasa, D-lactato-deshidrogenasa, y el componente II de la  $\alpha$ -metil glucosido fosfotransferasa se encuentran específicamente en la membrana interna. Las fosfolipasas, en cambio, parecen localizadas en la membrana externa. Otras enzimas como la UDP-hidrolasa, ribonucleasa I, y endonucleasa I, se encuentran en cambio en ambas fracciones. Los glicerofosfatos se encuentran también en ambas membranas pero con diferente distribución relativa.

Si la estructura de la membrana bacteriana fuese semejante a la de las células animales, sería posible solubilizar componentes de la misma de acuerdo a su distribución. Así, por ejemplo, las proteínas periplasmáticas mantenidas en la membrana por fuerzas electrostáticas serían solubilizables por variaciones tales como el pH. Para solubilizar las pro

teínas intrínsecas sería necesario el uso de detergentes que disminuyeran las interacciones hidrofóbicas presentes, y una vez separadas sus propiedades serían semejantes a las observadas en las mismas extraídas en las membranas celulares animales con su característica insolubilidad en solventes acuosos en ausencia de detergentes.

La reseña bibliográfica indica que las membranas de *Halobacterium* se disocian por efecto de alta concentración de sales en el medio (150). En membranas de *M. lysodeikticus* es posible liberar a ATPasa disminuyendo la fuerza iónica (151, 152, 153) y la NDH-deshidrogenasa al lavar las membranas con EDTA (127). La necesidad de algunos detergentes que deben estar presentes para solubilizar los componentes de las mismas, ha sido ya citado anteriormente.

La importancia de las interacciones entre proteínas en el mantenimiento de la estructura de la membrana se pone de manifiesto por lo menos en *M. lysodeikticus* por el hecho de que el tratamiento de la membrana con glutaraldehído inhibe la liberación de ambas enzimas (154). En las membranas sin tratar por el contrario se puede observar que la morfología inicial de la misma (fondo liso con partículas interiores y en los bordes) se modifica con la liberación de las enzimas antes mencionadas, mientras que otras enzimas (citocromo y succínico deshidrogenasa) permanecen aún en las membranas observables de apariencia totalmente lisa.

Estudios inmunológicos de membranas lavadas (155) indican la presencia de un número pequeño de componentes antigénicos que no tienen relación con el número de bandas observadas electroforéticamente en la solución de proteínas de la membrana con detergentes. Esta simplicidad también fue observada en membranas de *M. laidlawii* (156) en estreptococos (157) y en *B. megaterium* (158). Los resultados pueden interpretarse como la presencia de componentes poco inmunogénicos en estas membranas, o bien que muchos de los grupos inmunogénicos de estas proteínas están tan enterrados en el interior de las mismas que no es posible su determinación. Otra explicación sería que todas las proteínas diferentes de cada membrana poseen, sin embargo, algunos pocos componentes antigénicos comunes.

Por último, si las membranas bacterianas están formadas por unidades proteicas o lipoproteicas asociadas, experimentos de disociación de com

ponentes y su posterior reasociación debe permitir la reobtención de la membrana inicial con sus propiedades anatómicas y fisiológicas. Las conclusiones de Salton (93) para membranas de *M. Lysodeikticus* y otros indican que la disociación de sus componentes es posible para el uso de agentes capaces de competir con interacciones iónicas o hidrofóbicas, indicando la presencia de más de un tipo de interacciones en las membranas estudiadas. Además, es posible diferencias comparativas de estas fuerzas entre membranas de diferentes orígenes. La complejidad de los resultados sugiere que las asociaciones no son al azar, sino que por el contrario el lógico esperar distribuciones en regiones de la membrana de acuerdo a funciones específicas de los componentes observados.

Finalmente, cabe preguntarse también dónde se sintetizan las proteínas de las membranas bacterianas. La presencia de ribosomas unidos a la membrana (30%) han sido ya descritas para *E. coli* (159) y para *B. Megaterium* (160) y *M. Lysodeikticus* (161). Vambutas y Salton (161) indican que la síntesis de la ATPasa no se inhibe por efecto del cloramfenicol mientras que sí se inhibe la síntesis de algunas proteínas citoplasmáticas. Si este efecto inducido es debido a una diferencia de los ribosomas de la membrana o porque sea más difícil el acceso del cloramfenicol a la membrana no ha sido aún investigado. En *M. Laidlawii* las síntesis de proteínas de membranas en presencia de cloramfenicol no ha sido observada, pero sí se ha observado la continuación de la síntesis de fosfolípidos con la consiguiente disminución de la densidad de la membrana como efecto del aumento de la síntesis de lípidos.

En *S. Typhimurium* (162) también se ha observado la existencia de enzimas capaces de sintetizar fosfolípidos y lipolisacáridos en la membrana, pero sin conocerse aún el sitio de síntesis de las proteínas. Se sabe, sin embargo, que cationes como  $Mg^{2+}$  son necesarios para la integración de algunas enzimas (galactosiltransferasa, por ejemplo). En modelos sintéticos de membranas, no se sabe con seguridad, si la acción de los cationes es la de inducir cambios conformacionales en las proteínas o si actúan como un ligando entre la proteína y los lípidos de la monocapa experimental. Tampoco se conoce con seguridad el mecanismo por el cual los polisacáridos sintetizados en la membrana plasmática de estas bacterias son capaces de atravesar el espacio periplasmático para localizarse finalmente en la membrana externa.

De todo lo dicho, es fácil deducir que las membranas bacterianas aparecen como estructuras de fácil obtención y en condiciones de buena reproducción aun cuando esta última sea función de los métodos de purificación que permita obtenerlas sin contaminantes citoplasmáticos. Aunque se ha descrito la presencia de mesosomas, éstos parecen originarse por invaginación de la membrana sin que sus propiedades y funciones actualmente conocidas estén completamente aclaradas.

Las funciones de las membranas bacterianas incluyen transporte activo, transporte electrónico, fosforilación oxidativa, sitio de anclaje del núcleo para iniciar la división celular, síntesis de fosfolípidos y de los componentes de la pared. Presentan, además, ribosomas fuertemente unidos a las mismas cuya presencia y funciones no se conocen aún en forma definitiva.

Por su anatomía y propiedades son similares a las membranas celulares de organismos superiores y en sus componentes interactúan fuerzas probablemente de la misma naturaleza que las implicadas en estas últimas (asociaciones de lípidos proteínas, interacciones proteína proteína, etc.). Por la similitud de sus propiedades y la sencillez de su obtención en cantidades adecuadas resultan entonces convenientes para el estudio analítico de sus componentes y de su organización.

## JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

La membrana citoplasmática de *M. lysodeikticus* ha sido intensamente estudiada (163). Las condiciones de aislamiento y propiedades de la misma indican la existencia de una membrana tipo (164, 127) cuyos componentes (165, 140, 166, 167, 168) lipídicos y proteicos parecen organizarse en tal forma que es posible liberar gradualmente algunos de los mismos. Así, por ejemplo, ha sido posible solubilizar la ATPasa, (151, 152, 153, 154) por efecto de tampones de baja fuerza iónica, y la NADH deshidrogenasa por tampones conteniendo EDTA (127). La extracción de estas proteínas se acompaña por una reducción de la superficie granular de la subestructura membranosa (169) y conduce a la obtención de una membrana residual.

Se ha dicho en la introducción de esta tesis la posibilidad de observar dos tipos de membrana en estas bacterias, la membrana plasmática, y la membrana mesosomal, sin embargo, con los métodos empleados en el presente trabajo se supone que se obtiene un sistema de membrana plasmática mesosomal único (170).

Los métodos de cultivo y, por consiguiente, la obtención de concentraciones adecuadas de células de *M. lysodeikticus* y el aislamiento de sus membranas (171, 172, 173) eliminan uno de los mayores inconvenientes con que se encuentran los investigadores de membranas celulares de otros organismos (174, 28).

El objeto inicial de esta tesis era el de obtener un método adecuado para la solubilización de la membrana plasmática residual de *M. lysodeikticus*, y el fraccionamiento de sus componentes proteicos.

Las dificultades inicialmente encontradas para la solubilización de proteínas una vez extraídos los lípidos de esta membrana, han sugerido la necesidad de estudiar las condiciones para evitar la desnaturaliza-

ción de las mismas. Se iniciaron entonces estudios con el objeto de determinar la existencia de grupos SH en las mismas, y que puedan ser los causantes de ese proceso por formación de agregados.

Se ha estudiado asimismo el efecto de diferentes compuestos, como ditionito sódico e iodoacetamida, en la movilidad electroforética de proteínas de dicha membrana residual. También se estudia el efecto de estos compuestos en los espectros de absorción visible y ultravioleta de la membrana residual solubilizada.

Una vez solubilizadas estas proteínas y encontradas las condiciones de su fraccionamiento, se estudió la distribución de sus pesos moleculares, y se intentó su fraccionamiento por criba molecular.

Los espectros obtenidos y el fraccionamiento indicaban la presencia de otros componentes además de las proteínas, que resultó inesperado. Estos componentes comprenden ácidos ribonucleicos y azúcares, y se planteó entonces la determinación de técnicas adecuadas para su estudio. Estas técnicas se han extendido al estudio de la membrana tipo. Se ha determinado el contenido de ácidos nucleicos en la misma, así como la distribución electroforética de materiales conteniendo hidratos de carbono.

La presencia de algunos azúcares identificados en la membrana tipo sugirieron la necesidad de determinar si los mismos azúcares se encuentran en las membranas residuales, y su identificación en residuos libres de lípidos de las membranas estudiadas.

La identificación de hexosaminas entre otros azúcares sugirió la presencia de glicolípidos, glicoproteínas o lipoproteínas. El aislamiento de polisacáridos en una de las membranas residuales, indica que los polisacáridos deben ser también considerados como posibles componentes de las membranas.

Finalmente, se ha examinado el efecto del mercaptoetanol en la distribución electroforética de lípidos, hidratos de carbono y proteínas en la membrana tipo y la presencia de estos componentes en los residuos libres de lípidos de la misma.



## METODOS Y MATERIALES

### A) PARTE EXPERIMENTAL

#### M. LYSODEIKTICUS - CONDICIONES DE CULTIVO (167)

El medio de cultivo tiene la siguiente composición: 5% de bactoepna Difco, 0,1% de extracto de levadura, 0,5% de cloruro de sodio. Se ajusta el pH a 7,5 con hidróxido de sodio.

Se transfieren 400 ml de este medio a matraces de 2 litros, o 600 ml a matraces de 3 litros.

El medio sólido se prepara agregando 2% de Agar normal o 1,5% de Agar Difco al medio anterior.

La cepa de *M. lysodeikticus* NCTC 2665 se conserva en nevera y en medio sólido normalmente. Para cultivar en medio líquido se prepara un pre-inóculo, transfiriendo su cultivo de agar sólido a 50 ml de medio líquido: y se cultiva a 30°C durante 16 horas. Se transfieren luego 5 ml de este cultivo a los matraces de 2 ó 3 litros y se incuban por 24 horas hasta que la densidad óptica de una solución diluida al tercio sea de 1 a 750 nm. El organismo se crece en condiciones de fuerte aeración 50% de la agitación máxima del agitador New Brunswick.

Las células se recogen del medio por centrifugación a 10.000 g en frío (centrífuga Sorvall, modelo RC2-8 rotor GSA) y durante media hora. Se lavan a continuación dos veces con agua destilada y se someten a diferentes procedimientos para la obtención de membranas como se indica a continuación.

#### METODO DE OBTENCION DE MEMBRANAS

A lo largo de este trabajo, se llamará *membrana básica* o *tipo a* la obtenida de acuerdo al procedimiento de Salton y Freer (164) que en el microscopio electrónico aparecen como vesículas esféricas. Se llaman

*membranas residuales* a membranas en la que parte de sus componentes han sido eliminados por distintos tipos de tratamientos. Una de las membranas que se describen a continuación (R1) es similar a la obtenida anteriormente (127, 151, 152, 153, 154).

Para obtener membranas, las células bacterianas lavadas obtenidas como se indica anteriormente se suspenden en 150 ml de tampón Tris-ClH 0.05 M (pH 7.5) conteniendo 8 ml de cloruro de magnesio 1 M y 6 ml de lisozima (5 mg/ml). Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añade suficiente cantidad de solución de deoxiribonucleasa (5 mg/ml) (175) para disminuir la densidad de la suspensión de células. Luego se incuba otros 10 ó 15 minutos, se centrifuga 30 minutos a 27.000 g para obtener un sedimento que contiene las membranas bacterianas y un sobrenadante que se descarta.

#### OBTENCION DE MEMBRANA BASICA O TIPO (164)

El sedimento anterior se lava 4 veces con tampón Tris-ClH (pH 7.5) 0.05 M.

#### OBTENCION DE MEMBRANA RESIDUAL RS10

Se sigue el procedimiento anterior para obtener membrana básica continuando luego con tres lavados del sedimento con 0.03 M de tampón Tris-ClH conteniendo además 0.01 M de EDTA. Finalmente se lava dos veces con tampón Tris-ClH 0.003 M.

#### MEMBRANA RESIDUAL R<sub>1</sub> (127, 151, 152, 153, 154)

El sedimento de membranas inicial se lava tres veces con tampón Tris-ClH 0.03 M conteniendo 0.001 M EDTA, seguido por tres lavados con tampón de Tris-ClH 0.003 M.

#### MEMBRANA RESIDUAL R<sub>10</sub>

Se sigue el procedimiento indicado para la obtención de membrana R<sub>1</sub>, excepto que la concentración de EDTA empleada es de 0.01 M.

Los sedimentos se recogen siempre centrifugando a 27.000 g durante 30 minutos y a 4°C empleando la centrífuga Sorvall R C2-B. Los tampones de Tris-ClH son siempre de pH 7.5. La suspensión de membranas en el mismo tampón final es el material que se usa en algunos experimentos. En otros,

las membranas dializadas contra agua destilada durante 24 horas se liofilizan en liofilizador Virtis.

## SOLUBILIZACION DE MEMBRANAS

El estudio de las características químicas de los componentes de membranas como base para la racionalización de sus propiedades tiene dos corrientes metodológicas. Por un lado, la solubilización total de las membranas y la identificación de sus componentes, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, etc., sin interesarse por la actividad biológica de los mismos sino de su composición química. Otra dirección emplea en cambio métodos selectivos que separan componentes conservando sus propiedades biológicas y en un orden determinado.

Una de las características de los componentes de la membrana celular es su escasa solubilidad en condiciones fisiológicas, y que sólo casos extremos de pH, y/o detergentes inducen su aparente solubilización.

Esta aparente disolución no garantiza que sus componentes fundamentales existen en estado molecular interactuando con el solvente y no entre sí. En realidad puede haber ocurrido una reducción de partículas a tamaños no detectados por un examen macroscópico o visual, y que resisten a la fuerza gravitacional utilizada como criterio de solubilización.

La información bibliográfica indica la variabilidad de condiciones posibles respecto de los métodos de disolución de membranas (14, 49, 52, 56, 176, 177, 178, 179, 180, entre otros).

Específicamente, las membranas de *M. lysodeikticus* han sido fraccionadas con el uso combinado de detergentes iónicos y no iónicos completado con fraccionamiento salino (180, 181).

Los métodos basados en la disolución de proteínas en SDS se investigan en la actualidad considerando el efecto del detergente sobre la proteína (182, 183, 184, 185, 186, 187, entre otros). Las proteínas disueltas en SDS han sido también separadas de sus componente lipídicos con resinas (18, 188).

Sin entrar en la investigación del efecto del SDS en los componentes de las membranas estudiadas, el procedimiento comúnmente empleado en esta tesis es la disolución de las mismas en tampones conteniendo SDS en diversas concentraciones.

En algunos experimentos empleando la membrana R<sub>1</sub>, se determina prime-

ro la concentración de proteínas (Lowry y col. 189) y se agrega luego SDS en proporción de 4 mg/mg de proteínas. Este método se emplea para la disolución de membrana  $R_1$  antes de la extracción de lípidos con *n*-butanol que se detalla más adelante.

Se probaron inicialmente diferentes tampones, Tris-ClH de diferentes molaridades y pH 7,5; y acetato sódico de pH en el rango ácido, observándose que para los experimentos realizados con la membrana  $R_1$ , resultaba más conveniente el empleo de estos tampones con urea 0.5 M. Para las determinaciones de ácidos nucleicos con el Método 1 que se detalla más adelante, se utilizan membranas liofilizadas, y se suspenden éstas en agua para su determinación con el Método 2 (ver más adelante). Para la extracción de lípidos, las membranas liofilizadas se humedecen antes de su extracción empleando cloroformo-metanol, como se indica.

El análisis de hidratos de carbono se realiza en algunos casos en membranas liofilizadas, o fracciones de residuos obtenidos luego de extraer lípidos con cloroformo-metanol.

Para el estudio electroforético de los componentes de la membrana  $R_1$  las fracciones obtenidas luego de extraer los lípidos con butanol, y las fracciones obtenidas de las columnas con Sephadex G-200, las soluciones de las mismas se aplicaron a los geles en los tampones empleados en las técnicas especiales utilizadas. Estos tampones son diferentes del empleado en la electroforesis.

En el estudio electroforético de componentes (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos) de todas las membranas estudiadas en esta tesis, se utiliza en general el procedimiento de disolver las membranas liofilizadas en el tampón de la electroforesis, conteniendo SDS al 1% y/o mercaptoetanol al 0,5%.

Para otros análisis realizados, las suspensiones o disoluciones de membranas, residuos, soluciones que las contienen, se detallan específicamente en los mismos.

## EXTRACCION DE LIPIDOS DE MEMBRANAS DE M. LYSODEIKTICUS

Entre los numerosos métodos existentes para la extracción de lípidos se eligieron dos procedimientos: 1) Extracción con *n*-butanol, (190). 2) Extracción con una mezcla de cloroformo-metanol, (191, 192, 193).

La selección del primer procedimiento se basa en que éste fue ya empleado para la extracción de lípidos en suspensión de membrana de *M. lysodeikticus* por Salton (181). El autor indica la extracción de un 90% de lípidos y la solubilización de algunas enzimas conservando la actividad enzimática (ATPasa), y recuperando los citocromos en la interfase.

En un trabajo de Oparin y col. (194) en membranas de *M. lysodeikticus* se observa que la fuerza iónica estabiliza las proteínas en un 20 a 25% y el 80% de las proteínas de la membrana se mantienen por interacciones de carácter hidrofóbico. La presencia de enzimas solubles en la fase *n*-butanólica (181, 195, 196), sugiere la necesidad de estudiar las proteínas solubles en el tampón y en la interfase; así como las que pudieren solubilizarse al contener SDS el tampón a emplear.

#### A-EXTRACCION CON *N*-BUTANOL

##### Aplicación a la membrana R1. Obtención de fracciones S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e I

Por su carácter químico (a la vez hidrófilo y lipófilo) en *n*-butanol se reparte entre la fase acuosa y las moléculas de lípido, compitiendo con éstos para su acción con las proteínas. Además tiene la ventaja de que puede utilizarse en medio acuoso haciendo innecesaria la extracción exhaustiva inicial de agua del material a deslipidizar. Sin embargo, los primeros intentos resultaron negativos. El mayor porcentaje de proteína se presentaba en una interfase insoluble aun en solución de pH alcalinos (10,6), urea 8M, y cloruro de guanidinio 6 M.

Se observó entonces que si la interfase se trataba con mercaptoetanol se obtenía un espectro diferencial de absorción respecto de la proteína no tratada. Se pensó así que la desnaturalización se debía a la formación de agregados de proteínas. Finalmente se modificó el método original como se detalla a continuación.

Una suspensión R1 obtenida como se indica en la sección correspondiente se suspenden en tampón de acetato sódico 0.05 M y urea 0.5 M (pH 5.2). Luego se determina el contenido de proteínas por el método de Lowry y col. (189) y se agrega SDS en una concentración de 4-5 mg por mg de proteína. La solución se centrifuga a 27.000 g 30 minutos, descartándose el pequeño residuo que aparece. En algunos casos, se solubiliza a otros pH determinándose entonces el contenido de proteínas de

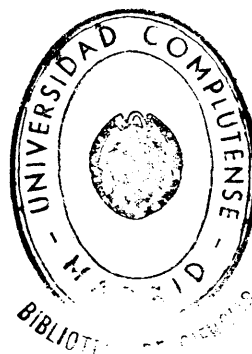
residuo. A esta solución de 25 a 50 ml conteniendo de 0.5 - 5 mg de proteína por mililitro se agrega ditionito de sodio (1.2 mg/ml de solución) para reducir los citocromos (189). Después de agregar iodoacetamida en varias concentraciones, se extraen los lípidos con *n*-butanol (40% peso/volumen) a 4°C y agitando continuamente, la suspensión se centrifuga a 10,000 g durante 10 minutos. Se observan entonces la presencia de tres zonas, una butanólica amarilla que contiene la mayor proporción de lípidos (se descarta), una interfase y una fase inferior acuosa ( $S_1$ ). Luego de extraer la fase butanólica con una jeringa se inclina ligeramente el tubo para adherir la interfase a las paredes del mismo y extraer la fase intermedia.

La interfase se suspende en aproximadamente un 1% del volumen inicial y en un tampón de acetato-urea pero conteniendo 1% de SDS.

La fase acuosa  $S_1$  se extrae dos o tres veces con *n*-butanol en la misma forma, hasta que el *n*-butanol sobrenadante quede incoloro.

Las interfases respectivas obtenidas en esta repetición del procedimiento se mezclan en la suspensión de interfase inicial y se repite la extracción de lípidos con el mismo procedimiento para obtener finalmente una fase acuosa ( $S_2$ ) y una interfase I. La solución  $S_1$  se dializa contra tampón conteniendo SDS al 0.1%. La solución  $S_2$  y la suspensión de I contra tampón conteniendo SDS al 1%. Como se verá luego, la solución  $S_2$  y la suspensión de I (que se disuelve luego de la diálisis) presentan la misma composición de proteínas (si se juzga por su comportamiento electroforético). Por consiguiente, en la mayoría de los experimentos se analizan en conjunto las fracciones  $S_2$  e I mezclándolas antes de dializarlas durante 24 horas. La diálisis se realiza con repetidos cambios de tampón hasta que las fracciones aparecen totalmente claras. En algunos casos, sin embargo, puede observarse una ligera turbidez indicando la necesidad de una nueva centrifugación.

El grado de solubilización de proteínas en cada fracción se determina luego de dializar y centrifugar (si fuere necesario) midiendo la concentración de proteínas con el método de Lowry y col. (39) usando seroalbúmina bovina como control.



## B-EXTRACCION DE LIPIDOS CON CLOROFORMO-METANOL

### Aplicación a membranas tipo, RS10, R1 y R10

Folch y colaboradores (191, 192, 193) describen un método para extraer lípidos de materiales biológicos con una mezcla de cloroformo-metanol. Señalan además que el extracto orgánico incluye la presencia de compuestos no lipídicos, como contaminantes, que pueden insolubilizarse si el extracto de cloroformo-metanol se evapora a sequedad en un rotovapor y se redisuelven luego los lípidos en el solvente original.

El residuo (insoluble en agua) es una mezcla de proteolípidos conteniendo proteínas, cerobrósidios, fosfatos en diferente concentración. Los autores recomiendan además un lavado del segundo extracto lipídico con una mezcla de cloroformo, metanol y solución salina. La fase acuosa superior separado luego de centrifugar contiene la mayor parte de contaminantes no lipídicos (glucosa, sales, urea, sacarosa, etc.), que se eliminan en esta forma.

Salton y Freer (164) aplicaron este procedimiento en membranas liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* recomendando una extracción previa con metanol (95%) repetida hasta la desaparición del color del sedimento. Luego de extraer el residuo con cloroformo-metanol, evaporar el extracto, reextraerlo en el mismo solvente y lavarlo como recomienda Folch, determinaron los lípidos gravimétricamente.

Posteriormente, Nachbar y Salton (127) presentan una composición de membrana tipo con un contenido de carbohidratos de 4,2% y 23,8% de lípidos.

Por otra parte, Gilby y col. (173) que extrajeron los lípidos de *M. lysodeikticus* por calentamiento a reflujo con metanol seguido de éter, obtienen un 27-28% de lípidos y alrededor de un 15% de hexosas en el material libre de lípidos.

Ambos grupos de investigadores determinan azúcares reductores luego de hidrolizar con ácido clorhídrico 2N, pero partiendo de membranas tipo (127) o de residuo libre de lípidos extraídos con éter y metanol (184).

Sin embargo, estos autores encontraron deficiencia en el contenido de hidratos de carbono, lo que sugirió la posibilidad de que parte de los azúcares se perdieran al hidrolizar la membrana completa, lo que no

ocurría al hacer la determinación en la membrana libre de lípidos. Sin embargo, la determinación cuantitativa de azúcares por antrona en el material no solubilizado en los matraces empleados para el secado de la fase orgánica, o en el sedimento que resultaba al dejar reposar esta última durante toda la noche. Se decidió entonces modificar el procedimiento como se indica a continuación.

Membranas liofilizadas (30-50 mg) se humedecen con 0.5 ml de agua y se extraen con metanol al 95% a 37°C hasta que el extracto es incoloro centrifugando cada vez a 5000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se extrae entonces 2 veces con cloroformo-metanol (2:1, v/v 10 ml cada vez) y luego de centrifugar se agrega la fase orgánica al extracto metanólico.

El residuo (material libre de lípidos) se seca en vacío hasta peso constante.

La fase orgánica (metanol y cloroformo-metanol) se evapora en el rotovapor a 45°C a sequedad y se vuelve a disolver en cloroformo-metanol dejándolo toda la noche a 4°C. Se decanta la solución de cloroformo-metanol (centrifugándola si es necesario) y se lava con una solución conteniendo cloroformo, metanol y agua en proporciones de 3:48:47 aproximadamente y, además, cloruro de potasio al 0.88%. Para el lavado, se utilizan 4 ml de esta última solución para los 10 ml de la fase orgánica. Se obtiene así una fase acuosa de lavado. Los recipientes empleados en la etapa de evaporación de la misma se lavan también con esta fase acuosa, que se guarda para determinar hexosas posteriormente. Parte del sedimento adherido a las paredes de los mismos se disuelve en agua.

El segundo extracto de cloroformo-metanol lavado, se evapora a sequedad en vacío hasta peso constante para determinar el contenido de lípidos. Correcciones de los contaminantes contenidos en los solventes orgánicos empleados se hacen tratando iguales volúmenes de los mismos a través de idénticos pasos. Su peso se deduce del peso de lípidos obtenido.

## ELECTROFORESIS

La electroforesis en poliacrilamida fue introducida en 1959 por S. Raymond y L. Weintraub (198). Es el resultado de la polimerización de un monómero (acrilamida  $\text{NH}_2\text{-CO-CH=CH}_2$ ) en N,N'-metil bis acrilamida



$(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2)$  catalizada por persulfato de amonio y TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletilendiamina). Se obtiene así un gen reticulado formado de largas cadenas más o menos entrecruzadas en función de la concentración de bis acrilamida.

La concentración de la acrilamida empleada se designa en general por la suma de concentraciones de acrilamida y bis acrilamida. La acrilamida es un soporte inerte, en que la separación de componentes se hace en función de su efecto de "criba". La posibilidad de una molécula de pasar a través de un tamiz depende del poro del tamiz y del tamaño de la molécula. El tamaño del poro depende esencialmente de la concentración total de acrilamida y en este sistema puede variarse con comodidad entre el 3 y el 30 por ciento en una variación de poro de 85 - a 20 Å (a menor concentración mayor poro) (199,200).

Se emplean en este trabajo geles al 7% preparados de acuerdo a Muñoz y colaboradores (153) y al 10% (120) preparados como se indica a continuación.

Soluciones A 48 ml de ácido clorhídrico 1 M; 36,6 g de Tris 0,23 ml Temed (N, N, N', N' tetrametiletilendiamina).

Solución C 28 g de acrilamida y 0,735 g de bisacrilamida en 100 ml de agua.

Solución de persulfato 0,14 g de persulfato de amonio en 100 ml de agua.

Para geles al 7% se mezclan: 1 parte A + 1 parte de agua + 2 partes de C + 4 partes de persulfato.

Para geles al 10% de acrilamida la solución C contiene 40 g de acrilamida y 1,0 g de bis acrilamida en 100 ml de agua, mezclándose en las mismas proporciones.

Cuando las electroforesis se realizan con SDS y mercaptoetanol en el gel, a las soluciones anteriores se agrega 0,01 ml de una solución de 1 ml de SDS (10%) y 0,05 ml de mercaptoetanol por cada ml de mezcla de poliacrilamida. Se obtiene así geles al 0.1% de SDS, y/o 0.05% de mercaptoetanol.

La polimerización se realiza en tubos de electroforesis (6,5 x 0,8 cm)

que por un extremo se fijan a una base sosten con orificios de igual diámetro y se aseguran con anillos de goma.

El volumen de solución para cada tubo es de 1.5 ml. Los tubos verticales se llenan con solución de poliacrilamida y luego agua y se dejan polimerizar en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. La capa superior no polimerizada se descarta y se lavan cuidadosamente las paredes del tubo con el tampón que se va a emplear. Los tubos se insertan en el aparato y se coloca tampón cuidadosamente en la parte superior de cada tubo. Las muestras se aplican con una micropipeta teniendo cuidado de que se extienda como una capa de mayor densidad (si es necesario se agrega solución al 50% de glicerina) en la parte superior del gel.

El tampón de electroforesis es una solución de Tri-glicocola (6 g de Tris, 28 g de glicocola en 10,1 de agua pH 8.3). Se utiliza como indicador de electroforesis una solución de bromofenol al 1%; se agregan 0,2 ml antes de comenzar la electroforesis a la parte superior del aparato.

La electroforesis se completa cuando el indicador (banda azul) llega a la parte inferior del tubo. La electroforesis se inicia a 2 mA por tubo durante los primeros 30 minutos y a 5-6 mA durante 30 ó 40 minutos.

Al terminar la electroforesis los geles se desprenden del tubo manipulando cuidadosamente una larga aguja alrededor de las paredes y bajo el agua; quedando listos para su posterior tratamiento.

## IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS (201)

Los geles se fijan en una solución de partes iguales de 10% de acético en agua y 10% de metanol en acético durante 4-6 horas.

Se transfieren luego a una solución formada mezclando partes iguales de una solución al 2% de Negro de Amido en 10% de acético y una solución al 10% de metanol en acético durante 12 horas. Para desteñir los geles, se vuelven a insertar en tubos de electroforesis cónicos que se colocan nuevamente en el aparato de electroforesis. La solución de aclarado usada para decolorar es ácido acético al 7%. Se continúa la electroforesis hasta que sólo quedan coloreadas las bandas de proteínas, quedando transparentes los extremos del gel.

En algunos experimentos se estudió la distribución de bandas por ab-

sorción del gel a 535 nm en el espectrofotómetro Gilford 2400 equipado con un transporte de modelo lineal 2410-S a una velocidad de 1 cm/min. de desplazamiento. Para determinar el porcentaje de distribución se copia la gráfica en papel con trazo de lápiz fino. Se recorta el área total (peso total) y luego cada área, obteniéndose el peso individual.

#### IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE HIDRATOS DE CARBONO (203)

Se probaron diferentes técnicas que fundamentalmente difieren en la naturaleza del fijador y en los tiempos de oxidación con ácido periódico y de reacción con fucsina (16, 204, 205, 206, 207). El procedimiento que produjo mejores resultados es el que se describe a continuación, que es una modificación del método de Keyser (203).

- 1.- Los geles se sumergen 10 minutos en 100 ml de etanol al 95% y luego 20 minutos en 10 ml de metanol-acético y agua (8:10:1) agitando con intervalos para evitar que el gel se adhiera al recipiente.
- 2.- Se oxida luego con una solución de ácido periódico (preparada en el acto) de 1% en 3% de acético, durante 50 minutos.
- 3.- Se elimina el exceso de ácido periódico lavando los geles repetidamente (3 ó 4 veces) durante 30 minutos con una solución de tiosulfotometabisulfito (disolver en 2 litros de agua 10 g de metabisulfito potásico y 60 g de tiosulfito sódico. Antes de usar mezclar un volumen de esta solución en un volumen de etanol al 95%).
- 4.- Se lavan los geles 2 veces con agua durante 3 minutos.
- 5.- Los geles se colorean con una solución de fucsina y metabisulfito potásico durante 50 minutos en la oscuridad, cubriéndose los recipientes con un paño negro o con papel de aluminio. Esta solución se prepara de la siguiente manera: disolver 10 g de metabisulfito potásico en 2 litros de agua conteniendo 21 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se agrega luego 8 g de fucsina básica y se agita mecánicamente 2 horas a temperatura ambiente. Se deja reposar otros dos horas y se decolora luego la solución con carbón activado (Norit o Darco G-60), filtrándose dentro de los 15 minutos. La solución ligeramente amarilla o incolora se guarda en la nevera en frasco oscuro y protegido de la luz.

- 6.- Los geles se lavan luego con una solución de etanol-sulfito, dos veces durante 5 minutos y varias veces durante 30 minutos, dejándolos luego toda la noche en el agitador (New Brunswick Giratory Shaker). La solución de etanol sulfito se prepara como se indica a continuación: Disolver 5 g de metabisulfato de potasio en 1 litro de agua destilada, 1 litro de etanol de 95% y 9 ml de ácido clorhídrico concentrado.
- 7.- Se lavan con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N durante 15 a 30 minutos.
- 8.- Se guardan en solución de ácido acético al 7%.

Las bandas coloreadas desaparecen con el tiempo.

#### IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE Fe (208)

Se prueban diferentes técnicas para la identificación de proteínas conteniendo hierro en el electroforetograma (204, 209). El principal problema estriba en la presencia de SDS en el gel que dificulta los métodos corrientes de tinción. El método seguido es el de Beaton y colaboradores (208) con Sal de Nitrosa R. Se fijan las proteínas en los geles por inmersión durante dos horas en una mezcla de metanol, acético, agua, (9:10:1 v/v/v). Se sumergen luego durante 15 minutos en una solución de cloruro de hidroxilamina al 1%, acetado de sodio al 2,7%, ácido acético glacial 1,5%, y Sal de Nitrosa R al 0,5%. Se lavan seguidamente en metanol acético y agua (50:50:10 v/v/v) durante 2 horas. La banda conteniendo hierro aparece teñida de un color verde claro.

#### IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE ACIDOS NUCLEICOS

Acidos nucleicos y otros mucopolisacáridos y polielectrolitos se identifican por el método de Clarke (204). Se sumergen los geles durante 1 hora en ácido acético 1 M y se tiñen luego, con una solución al 0,1% de azul de toluidina en un 1% de acético durante una hora. El exceso de colorante se extrae lavando el gel con agua destilada varias veces y durante toda la noche en el agitador giratorio antes mencionado. Los geles pueden guardarse en una solución de 4% de glucosa en 0.02 M

Tris (pH 7,9) con 0.117 g CINA y 0.0744 g de EDTA, pero aún en estas condiciones se decoloran con el tiempo (210).

Para confirmar la presencia de ácido ribonucleico en los distintos tipos de membranas, las alícuotas de suspensiones de membranas se someten a la digestión con ribonucleasa como se describe a continuación (211).

Aproximadamente 2 mg de membranas liofilizadas se suspenden en 1 mg de tampón de Tris-ClH (0,2 M, pH 7,5) conteniendo EDTA ( $2 \times 10^{-3}$  M) y RNAasa (0,1 ml de una solución de 5 mg/ml). La suspensión se incuba durante 18 horas a 4°C. El agregado de SDS (4 mg/mg de proteína) clarifica inmediatamente la suspensión. Alícuotas de estas fracciones y de controles en las que no se agregó la RNAasa se analizan electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% usando el tampón de Tris-glicina y 0,1% de SDS.

## IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE LIPIDOS (212)

Como en el transcurso de esta investigación resultaba interesante comprobar la presencia (o ausencia) de lípidos en diversas preparaciones de membranas, se utilizaron las siguientes técnicas de fijación y coloración (212, 213).

- 1.- En algunas electroforesis, se detectaron lípidos fijando los geles en ácido tricloroacético al 20% durante 1 hora. Se tiñen luego con una suspensión de Sudan III (preparada disolviendo Sudan III en etanol al 60%) a partes iguales con tricloroacético al 20%. Luego de incubar el gel a 37°C durante 16 horas se decolora lavando con agua y tratando de desprender las partículas de suspensión adheridas a la superficie del gel. Se sumergen luego en una solución de metanol en 20% de tricloroacético (40:60 v/v) hasta que se decolora el gel excepto las bandas de lípidos, que se fijan luego en una solución de 0,2% de iodo en 7% de ácido acético.
- 2.- Una modificación que permite la observación de mayor número de bandas es la siguiente. Se fijan los geles con una solución de ácido perclórico al 20% durante 2 horas, se sumergen luego en una solución a partes iguales de Sudan III y solución al 20% de perclórico durante varios días a 37°C.

Se decoloran luego lavando primero con agua como se indicó anteriormente, y con una solución del 50% de metanol. Se fijan finalmente las bandas con la misma solución de iodo en ácido acético. Se guardan los geles en solución al 7% de acético permaneciendo las bandas visibles durante mucho tiempo. Las bandas conteniendo lípidos aparecen coloreadas de un color rojizo o pardo sobre el fondo amarillento del gel.

## DETERMINACION ELECTROFORETICA DE PESOS MOLECULARES

Las técnicas electroforéticas de fraccionamiento introducidas por Orstein (214) y Davis (215) fueron aplicadas a geles de poliacrilamida y SDS en muestras reducidas con mercaptoetanol para la determinación de pesos moleculares. Maizel (216), Viñuela y colaboradores (217) y otros (218, 219, 220, 221, 222, 223), observaron que en muchas proteínas reducidas la velocidad de migración electroforética es función del logaritmo de su peso molecular. Se observan, sin embargo, que algunas proteínas tienen un comportamiento anormal (224, 225, 226).

Soluciones de membrana  $R_1$  deslipidizadas con butanol y acetiladas con iodoacetamida fueron analizadas electroforéticamente en geles al 7% sin mercaptoetanol. Soluciones de seroalbúmina bovina, pepsina, tripsina, citocromo C, gamma globulina, se utilizaron como indicadoras. Estas soluciones se disuelven en el tampón de electroforesis conteniendo SDS al 1%. El gráfico del logaritmo de sus pesos moleculares en función de su movilidad se construye como lo describen Dunker y Eueckert (22) para los pesos moleculares de los polímeros de albúmina, considerándose, además, como monómero la banda más rápida de migración de cada componente puro.

## FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES POR CRIBAS MOLECULARES

### A- GELES DE SEPHADEX

#### Sephadex G-25

Se utiliza para separación de albúmina reducida con mercaptoetanol del exceso del reductor. La resina (10 g) se lava como lo indican los fabricantes (227) dejándoseles absorber agua en un baño hirviente duran

te 1 hora. Se equilibra luego con una solución de tampón de acetato sódico (0.033 M pH 4.6) con 2,5% de SDS y 0,5 M de urea hasta que el eluyente tenga el mismo pH. La resina equilibrada se transfiere a una columna de 2,5 cm x 35 cm. Para ello, la suspensión de resina contenida en un frasco de agitación con salida a nivel inferior se hace entrar por una goma conectada a la parte superior de la columna que esté llena en 1/3 de su volumen con tampón. El paso de la suspensión del gel del recipiente a la columna se realiza lentamente y en forma continua hasta alcanzar la altura deseada. Los volúmenes de exclusión y retención de partículas se miden con azul dextrano (exclusión) y mercaptoetanol (retención) detectando los picos a 630 nm y 280 nm respectivamente.

La resina Sephadex G-25 se usa también para concentrar. Para ello, se coloca la solución en un tubo de diálisis que se envuelve en una lámina de papel plateado conteniendo una cantidad variable de resina. Se mantiene en nevera hasta que la reducción alcanza el volumen deseado.

#### Sephadex G-200

Se utiliza para el fraccionamiento de proteínas de membrana R1 deslipidizadas con *n*-butanol. La resina se equilibra como se indicaba en el caso anterior, pero con un tampón de bicarbonato de amonio 0,05 M, EDTA 0.005 M, y 1% SDS y se transfiere a una columna de 2,5 x 75 cm. Las proteínas (10-20 mg) a fraccionar, se dializan para equilibrarlas con el mismo tampón. La elución de fracciones se consigue agregando mayores volúmenes del mismo.

El volumen de exclusión de las partículas no retenidas o incluidas (triptófano) se determina con una solución de azul dextrano al 0,2% y triptófano al 2%, midiendo la absorción óptica a 630 nm para el dextrano y de 240 nm para el triptófano.

La elución de proteínas se realiza en el mismo tampón recogiendo fracciones de 2,5 ml en el colector de fracciones Bekman, modelo 133 A, y midiendo la absorción de cada solución a 280 nm y/o 260 nm.

## B - FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES POR ULTRAFILTRACION

La concentración de proteínas por ultrafiltración es un sistema conocido y utilizado desde algunos años (228). La aplicación de esta técnica a la concentración de tripsina (229, por ejemplo, indica que en algunos casos y en condiciones de temperatura y sales inorgánicas adecuadas es posible recuperar hasta el 90% de la actividad enzimática.

Porter (229) hace una revisión de la naturaleza del fenómeno que ocurre cuando materiales biológicos se purifican por membranas de "complejos polielectrolíticos" o membranas de Amicón (230). Utilizando membranas adecuadas, surge la posibilidad de fraccionar proteínas en función de sus pesos moleculares.

En algunos experimentos se aplica esta técnica al fraccionamiento de proteínas y otros componentes presentes en la membrana R1 tratada con *n*-butanol (fracción S<sub>2</sub> + I).

### Aplicación a la fracción S<sub>2</sub> + I

La fracción (S<sub>2</sub> + I) de membrana R1 (13 mg) se insertan en el aparato de ultrafiltración Diaflo en células de 65 ml de capacidad y con membranas de diferentes capacidades de retención.

En las fracciones retenidas o eluidas se determinan proteínas, hexosas y ribosa como se detalla más adelante.

## IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE AZUCARES

En este trabajo se identifican componentes azucarados por cromatografía descendente en papel Whattman No. 1 utilizando una mezcla de acetato de etilo: piridina: agua 80:20:1 (v/v/v) (231). El tanque de cromatografía se satura con el mismo solvente en proporciones 40:10:60 (v/v/v), respectivamente.

Membranas libres de lípidos por extracción con cloroformo-metanol se hidrolizan en diversas concentraciones de ácido clorhídrico durante tiempos variables de 1 - 8 horas. Las membranas (2-4 mg) se pasan a los tubos de hidrólisis que se cierran a la llama después de añadir el ácido. La hidrólisis se realiza a 105°C.



El exceso de ácido se elimina por calentamiento (40°C) al vacío en un rotovapor. Se lavan las paredes del tubo con 0,2 - 0,5 ml de agua 2 ó 3 veces, eliminando cada vez el solvente de la misma forma.

Se traspasa el contenido del mismo (en 0,5 ml de agua) a pequeños tubos cónicos que se centrifugan a fin de evitar la presencia de residuo sólido en la muestra. Se evaporan nuevamente los tubos en desecador. El residuo se disuelve en el volumen deseado de agua (20-50 micro-litros) y se transfiere al papel de cromatografía en la forma usual.

Una solución conteniendo mezclas conocidas de azúcares al 0,1% en agua se aplica como patrón en una de las secciones del papel (20 micro-litros). El fraccionamiento cromatográfico se realiza durante 16-22 horas a temperatura ambiente.

## REACCIONES DE COLORACION

### AZUCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores se identifican con ftalato de anilina (232) (0,93 g de anilina y 1,66 g de ácido ftálico en 100 ml de butanol saturado con agua). La hoja de papel seca, se pulveriza con la solución indicada y se calienta 15 minutos a 105°C. Se revelan aldopentosas, aldohexosas y ácidos urónicos.

### CETOHEPTOSAS

Se identifican por la reacción de Bial como lo indican Klevstrand y Nordal (233). Se pulveriza el papel con una solución de 0,5 g de orcinol y 15 g de ácido tricloroacético en 100 ml de butanol saturado con agua. Se calienta a 105°C, 15-20 minutos. Las cetoheptosas se ven color azul verdoso, las cetoheptosas o poliosidos conteniendo cetoheptosas dan color amarillento.

### HEXOSAMINAS (234))

Los amino azúcares se identifican con la reacción de Elson y Morgan como lo indica Partridge (234) con las siguientes soluciones.

a) 1. 0,5 ml de acetyl acetona en 50 ml de butanol.

2. 5 ml de hidróxido de potasio en 50 ml de etanol al 20%.

Antes de usar, mezclar 0,5 ml de la solución (2) a 10 ml de la solución (1).

b) Se disuelve 1 gramo de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 30 ml de etanol, se agregan 30 ml de ácido clorhídrico concentrado y se lleva a 180 ml con butanol. Se pulveriza la hoja seca con la solución a) y se calienta 5 minutos a 105°C. Se pulveriza luego con b) y se calienta a 105°C.

Las hexosaminas libres dan un color rojo cereza. La N-acetilglucosamina un color violeta púrpura. Para aplicar las soluciones de revelado del cromatograma, se emplea el pulverizador Shandon Laboratory Spray Gum.

## DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SH

### APLICACION A SEROALBUMINA BOVINA Y A SOLUCION DE MEMBRANA R1

La estimación de grupos SH en la membrana residual R1 se realiza midiendo el cambio de absorción a 255 nm cuando se añaden alícuotas de muestra a 3 ml de solución titulada de *p*-cloromercuriobenzoato (PCMB) (a pH 4,6 en tampón acetato 0,033 con 2,5% de SDS y urea 0,5 M) contenida en una cubeta del espectrofotómetro Gilford. La solución de *p*-cloromercuriobenzoato se titula con glutatión (236) como se indicará a continuación.

Para la determinación se utilizan las cuatro cubetas del espectrofotómetro. La primera contiene tampón, sirve para ajustar el cero del instrumento. La segunda conteniendo tampón (3 ml), da al agregar alícuotas de muestra, lecturas de absorción de la misma. La tercera y cuarta contiene 3 ml de PCMB titulado. Al agregar alícuotas de muestra se produce una absorción que es función de la absorción de la muestra y del mercáptido formado.

Para la construcción de la curva de titulación, la lectura de la segunda cubeta se resta a las lecturas de la tercera y cuarta. Estos valores se corrigen de factores de dilución y representan la absorción del mercáptido. El promedio de los valores obtenidos en las dos últimas cu-

32

betas (corregido de la dilución) se representa frente a los microlitros de muestra agregados. La pendiente es función del coeficiente de extinción del mercaptido formado, y la interacción de las dos líneas de diferente pendiente es el punto final de la titulación.

#### TITULO DE LA SOLUCION DE P-CLOROMERCURIOTENZOATO (236)

Se pesan 10-15 mg de glutathione de pureza conocida y se disuelven en 10 ml de tampón. Se pesan de 8 a 10 g de -cloromercuriotenzoato y se disuelven en 0,5 ml de hidróxido de sodio 0,5 M. Se llevan a 25 ml con agua y se centrifugan. De esta solución se toman 2 ml y se llevan a 25 ml con el tampón empleado en la titulación. Esta solución se prepara extemporáneamente y se conserva protegida de la luz (envolviendo el recipiente en papel plateado). Todas las soluciones a emplear así como la muestra deben ser perfectamente homogéneas cuando se las examinen a través de la luz, pues cualquier partícula inducirá a errores en la determinación. Se agregan alícuotas de glutathione o tampón a las soluciones contenidas en las cubetas como se indica anteriormente para calcular la molaridad de la solución de PCMB.

La molaridad del glutathione (GSH) será:

$$\frac{\text{mg GSH}}{307} \times \text{pureza} \times 0,1$$

y la concentración del PCMB:

$$\text{Molaridad de GSH} \times \frac{\text{vol de GSH en el punto de interacción}}{3}$$

#### TITULACION DE MUESTRAS

Una vez conocida la molaridad de la solución de PCMB, se procede a la determinación de grupos SH en la muestra. El resultado se expresa como moles de SH por moles de proteínas o, si no se conoce su peso molecular, por  $10^5$  g de proteína.

## TITULACION DE GRUPOS SH EN SEROALBUMINA BOVINA Y SEROALBUMINA BOVINA REDUCIDA

El método fue inicialmente aplicado a una solución de albúmina (50 mg/ml) para calcular los SH libres. También se titularon grupos SH de una solución de albúmina reducida con mercaptoetanol como se indica a continuación (237), 50 mg de seroalbúmina bovina se disuelven en 1 ml de tampón acetato (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS; se le agrega 1 microlitro de mercaptoetanol por mg de proteína y se ajusta el pH a 8 con metilamina. Luego de burbujear  $N_2$  en la solución por algunos minutos se tapa y se incuba la solución a 36°C durante 4 horas.

Para liberar la solución del exceso de mercaptoetanol, se pasa la solución por una columna de (1 x 40) cm de Sephadex G-25, equilibrada con tampón acetato conteniendo 2,5% de SDS. Luego de aplicar la muestra, la columna se lava con el mismo tampón recogiendo volúmenes de 4 ml del eluyente. Para determinar la presencia de mercaptoetanol y proteínas, se precipitan las proteínas contenidas en 1 ml de cada tubo con 1 ml de solución de ácido tricloroacético al 30%. Se filtra, y sobre el filtrado se detecta la presencia de mercaptoetanol (si lo hubiere) por el precipitado que se forma al agregar a 0,5 ml de una solución saturada de acetato de mercurio. Para la titulación de grupos SH en albúmina reducida, se toman aquellos tubos que no detectan presencia de mercaptoetanol. En estas soluciones se calcula la concentración de albúmina por el método de Lowry y col. (189).

## TITULACION DE GRUPOS SH EN SOLUCION DE MEMBRANA R1

Se obtienen membranas R1 de *M. lysodeikticus* como se indica anteriormente. El sedimento de membranas residual se suspende en tampón de acetato sódico-urea (pH 4.6) y se calcula el contenido de proteínas con el método de Lowry y col. (189) que se detalla más adelante en esta sección. Se ajusta el volumen para obtener una concentración de 5-6 mg/ml de proteínas, y se disuelven con SDS al 2.5%. Se centrifuga la solución a 25.000 g 30 minutos y se desecha cualquier sedimento que pudiera aparecer. En esta solución se vuelve a determinar la concentración de proteínas y es la que se emplea para la titulación de grupos SH.

## ESTIMACION DE ACIDOS RIBONUCLEICOS

Los métodos empleados generalmente para la estimación de ácidos nucleicos, se basan fundamentalmente en la extracción de los mismos con ácido perclórico, antes o después de extraer lípidos, y en diferentes condiciones de temperatura y concentración (238, 239). Su determinación cuantitativa se basa en el análisis del contenido de fósforo, y/o ribosoma, (240, 241) o su determinación espectrofotométrica (242, 243).

### METODO 1 DE EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS (244)

#### Aplicación a membranas tipo, R1, R10 y RS10

Estimación de ácidos nucleicos después de extraer con ácido perclórico.

Membranas liofilizadas (10-20 mg) se extraen dos veces con 2 ml de ácido perclórico 0,2 M a 10°C durante 1 hora. Después de centrifugar (20 min. a 22.000 g), los sedimentos se extraen 2 veces con ácido perclórico 0,5 M a 70°C durante 1 hora. Ambos sobrenadantes (de la extracción con 0,2 M de ácido perclórico y 0,5 M de ácido perclórico) se utilizan para la determinación de ribosa (240) con orcinol.

La extracción con ácido perclórico así descrita se realiza también con el sedimento obtenido luego de extraer lípidos con cloroformo-metanol descrito en la sección correspondiente.

### METODO 2 DE EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS (123)

#### Aplicación a membrana tipo, R10, R1, RS10 y fracciones S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> + I obtenidas al extraer R1 con n-butanol

Extracción y estimación de ácidos nucleicos por fraccionamiento inicial con ácido tricloroacético.

Membranas liofilizadas (10-20 mg) y los residuos de extraer lípidos con cloroformo-metanol (ver sección correspondiente) se suspenden en agua destilada, y se obtiene un precipitado por el agregado de igual volumen de ácido tricloroacético al 10%. Luego de centrifugar (4000 g a 4°C 30 minutos) se decanta el sobrenadante que se guarda para la estima

ción de nucleótidos y polisacáridos o hexosas solubles. El sedimento se extrae con alcohol al 70% conteniendo 0,1% de ácido perclórico y luego con alcohol etílico al 70%. Los sobrenadantes respectivos se analizan posteriormente para determinar ribosas y hexosas.

Los lípidos se extraen luego por calentamiento con metanol a 37°C se guido por acetona-metanol (192) (7:2 v/v). Los residuos se extraen con ácido perclórico 1 M a 4°C, durante 18 horas, y luego con ácido perclórico 0,5 M a 70°C durante 20 minutos.

En todos los casos mencionados, se separan los sedimentos por centri fugación a 15.000 g durante 20 minutos, excepto en la extracción de lípidos que se realiza transfiriendo cuantitativamente la suspensión a tu bos de vidrio que se centrifugan a 2,500 rpm durante 10 minutos.

El sedimento resultante después de la extracción con ácido perclórico se lava varias veces con agua y se liofiliza.

El sobrenadante (lavado acuoso del sedimento) se usa también para la determinación de hexosas, heptosas y pentosas.

Estas determinaciones, se realizan también en todos los sobrenadantes obtenidos durante este procedimiento.

Este procedimiento se utiliza también en algunos casos, para la esti mación de ácido nucleico en soluciones de membrana R1 deslipidizadas con *n*-butanol-(fracción S<sub>2</sub> + I) y obtenidas como se indica en la sección correspondiente.

## ESTIMACION CUANTITATIVA DE RIBOSA

### 1. Reacción de orcinol (241)

Alicuotas de las soluciones obtenidas como se indica en la sección anterior, se llevan a 1,5 ml con agua. Se agregan luego 3 ml de un reac tivo (preparado con 0,5 ml de solución del 10% Cl<sub>3</sub>Fe. 6H<sub>2</sub>O en 100 ml de ácido clorhídrico concentrado) y 0,2 ml de una solución de orcinol (pre parada en el momento de usar con 100 mg de orcinol por ml de alcohol al 95%) y se calienta en baño hirviendo de agua durante 20 minutos. La concentración de pentosa se determina por la diferencia de absorción óptica a 670 y 580 nm utilizando como patrón una solución conocida de ribosa (40 microgramos/ml) tratados en las mismas condiciones que la muestra.

En estas condiciones, hexosas, sedoheptosas, 2-desoxiribosa, metilpentosas, y ácidos urónicos reaccionan con orcinol, pero la glucosa forma un compuesto con absorción a 580 nm y los gluco, mano o galoheptosas dan un color verde con máxima absorción a 665 nm, y sedoheptulosas forman un compuesto marrón con orcinol, que tienen absorción máxima a 580 nm. Ribulosa forma un máximo de absorción a 540 nm.

En algunos casos se determinan pentosas con este método en el sedimento final obtenido luego de la extracción de ácidos nucleicos con el método de Ghosh y Murray (123).

Inicialmente, el método se aplicó para la determinación de ribosa como lo describen Salton y Freer (163) en suspensión de membranas, pero se observó, que la presencia de lípidos interfería en la determinación de ribosa. En algunos experimentos iniciales se observó la presencia de ribosa como interferencia en la determinación de hexosas. También se observó la presencia de material conteniendo ácidos nucleicos en las fases lipídicas, extraídas con cloroformo, metanol, y reextraídas con ácido perclórico 0,2 y 0,5 M. Su presencia se identificó por absorción espectrofotométrica a 260 nm, pero su determinación cuantitativa por el método del orcinol induce a resultados de difícil interpretación.

## 2. Identificación de pentosas con la reacción de cisteína (245)

Para esta determinación se utiliza el método de Dische y col. (245). A 1 ml de solución conteniendo 10 a 15 microgramos de pentosa se agregan enfriando 4 ml de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agita y los tubos se sumergen en un baño de agua fría hasta que la temperatura de la reacción llegue a ser la ambiental. Los tubos se mantienen 2 horas sin refrigerar agitando cada tubo para evitar la formación de burbujas. Se agrega luego 0,1 ml de una solución al 3% de clorhidrato de cisteína.

Se lee la absorción óptica de la reacción a los 15 minutos de la adición de cisteína. La diferencia de las densidades ópticas leídas a 390 y 425 nm da los valores de pentosa corregidos para la absorción de otros azúcares que pudieran estar presentes.

Para pentosas, hexosas y ácidos urónicos, la reacción se completa a los 10 minutos. Metilpentosas y DNA reaccionan mucho más lentamente. To

dos estos azúcares tienen máximos de absorción entre 375 y 410 nm. Los espectros de pentosas y ácidos hexurónicos son casi idénticos. En cambio, los espectros de DNA, metilpentosas y hexosas son muy diferentes, siendo sus máximos a 435, 400 y 408 nm, respectivamente. Eritrosa y eritrosa no absorben en este rango de longitudes de onda.

#### DETERMINACION DE ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO

Se determina por la reacción de la difenilamina (246) en sedimentos de membrana liofilizada, los resultados negativos indican la ausencia de DNA en las mismas.

#### DETERMINACION CUANTITATIVA DE FOSFORO

Se basa en la determinación de fósforo inorgánico como derivado fosfomolibdico (247) después de la oxidación del material biológico.

La aplicación de este método para la estimación del contenido de ácidos nucleicos se basa en la completa extracción de lípidos, y de material biológico que contiene fósforo (nucleótidos, fosfo-proteínas, etc.).

Para determinar el contenido de fósforo total en la muestra se concentra hasta un volumen aproximado de 0,300 ml, se le añade luego 0,3 ml de una mezcla oxidante (30.6 ml de ácido sulfúrico concentrado, 6,7 ml de ácido perclórico al 70%, y agua a 100 ml) y se calienta primero durante una hora entre 90-95°C, y luego dos horas a 165°C, agregando algunas gotas de agua oxigenada o de ácido nítrico, si fuera necesario clarificar completamente la solución. Después de enfriar, se añaden 3 ml del reactivo preparado extemporáneamente mezclando 9 ml de solución A con 1 ml de B y 7 ml de agua (Reactivo A = 1 ml de acetato de sodio 1 M + 1 ml de molibdato de amonio al 2,5%. B = ácido ascórbico al 10% preparado antes de usar).

Se calienta 90 minutos a 38°C y se lee la absorción óptica a 650 nm utilizando como testigo diferentes concentraciones de fósforo procedente de solución de 0,500 mg/ml de ATP (Adenosintrifosfato de sodio y potasio).

El espectrofotómetro se ajusta a 0 con un blanco de reactivos que contiene agua en lugar de la solución ATP. El resultado se expresa como contenido de fósforo.



## DETERMINACION ANALITICA DE OTROS HIDRATOS DE CARBONO

La presencia de azúcares (glucosa, manosa, galactosa, ribosa y hexosaminas) ha sido ya indicada por Salton y Freer (164) y Gilby y colaboradores (173) en las membranas tipo de *M. lysodeikticus*, pero no fueron analizadas las membranas residuales de extraer ATPasa obtenidas por Muñoz y colaboradores (169). Interesa determinar si estos azúcares forman parte de las diferentes membranas obtenidas.

Se analizaron hidratos de carbono en las siguientes fracciones obtenidas de la extracción de lípidos con cloroformo-metanol.

- 1.- Sedimento extraído con cloroformo-metanol.
- 2.- En la fracción acuosa obtenida al lavar el extracto de lípidos, como se indica en el método de extracción.

También se determinaron hidratos de carbono en las fracciones obtenidas en la extracción de ácidos nucleicos con el método de Ghosh y Murray (41) o Método 2. Estas fracciones, se designan como tricloroacético (TCA); alcohol perclórico (AP); alcohol etílico (A); ácido perclórico 1M (1M PCA); ácido perclórico 0,5 M (0,5 M PCA); residuo y lavado acuoso del residuo.

## DETERMINACION DE HEXOSAS (248)

La determinación analítica se basa en el color obtenido en la reacción de oxidación de azúcares con siteína (248).

El material a analizar (1-3 mg de materia sólida) o alícuotas de soluciones, se llevan a 1 ml con agua. Se enfrían en agua helada, se agrega 4,5 ml de una solución de ácido sulfúrico (preparado agregando a 6 ml de ácido sulfúrico concentrado 1 volumen de agua). Luego de algunos minutos se llevan a temperatura ambiente transfiriendo la gradilla a otro recipiente con agua. Se transfiere luego a un baño de agua hirviendo, manteniéndose en la misma durante 3 minutos. Se enfría luego rápidamente a temperatura ambiente. Se agrega entonces 0,1 ml de solución de cisteína a cada tubo (preparada con clorhidrato de cisteína al 3% en agua).

Se deja reposar durante dos horas, agitando periódicamente cada tubo en un Super-mixer (Lab. Line Instruments Inc.) para obtener soluciones

homogéneas.

La determinación analítica se realiza leyendo cada tubo en el espectrofotómetro Gilford a 380 y 415 nm. En estas condiciones, la absorción es proporcional a la concentración de hexosas, eliminándose las interferencias debidas a la presencia de pentosas, metilpentosas, aldoheptosas, entre otras.

La identificación cualitativa de algunos azúcares se hace a las 48 horas de la reacción, leyendo las curvas de absorción en el espectrofotómetro Perkin-Elmers. Así, galactosa y sorbosa dan un color azul, glucosa y fructosa, verde; y manosa, amarillo. Aldo y ceto heptosas dan un color naranja que se convierte en rosado con un máximo de absorción a 506 y 510 nm que es estable durante varios días.

Los resultados se expresan como manosa utilizando alícuotas de una solución de manosa de 0,200 mg/ml. Se corrige cada muestra de su absorción específica utilizando alícuotas a las que se agrega agua en lugar de la solución de cisteína.

#### DETERMINACION ANALITICA DE HEPTOSAS (249)

La presencia de heptosas como constituyentes de polisacáridos de bacterias Gram- es ya conocida, (250, 251, entre otros). También fueron observados en las fracciones de paredes obtenidas luego de separar los polisacáridos por diferentes medios.

Sin embargo, su presencia no fue detectada, al menos hasta ahora, en membranas de bacterias Gram+. Los espectros de absorción a diversas longitudes de ondas de las reacciones con orcinol y sulfúrico-cisteína para la determinación de ribosa y azúcares reductores, indujeron a pensar en la presencia de heptosas y se emplearon entonces algunos métodos para su determinación analítica.

Se utiliza el procedimiento de Wright y Rebers (249). El método es una modificación del método de Dische y Osborn (125, 253) que permite la determinación de heptosas en presencia de hexosas. El método se aplicó para la determinación de heptosas en el residuo de membranas obtenidas luego de extraer lípidos con cloroformo-metanol aun cuando los autores lo aplican a la determinación de lipopolisacáridos.

Alícuotas de muestra (0,5 a 1 mg) se suspenden en 0,5 ml de agua y

se agregan 4,5 ml de ácido sulfúrico (ácido sulfúrico: agua 6:1 v/v) manteniendo los tubos sumergidos en un baño de agua helada. Los tubos se agitan vigorosamente durante 3 minutos en frío y se dejan luego a temperatura ambiente algunos minutos.

Se agrega luego a cada tubo 0,1 ml de una solución del clorhidrato de cisteína en agua (hecha al 3%) y se calienta durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo. Para determinar heptosas, se lee en el espectrofotómetro la absorción óptica a 505 y 545 nm.

#### EXTRACCION DE POLISACARIDOS (254)

La identificación de material conteniendo hidratos de carbono en las electroforesis de diferentes tipos de membranas indujo a un preliminar estudio de su naturaleza. Para ello, 20 mg de membrana RS 10 se extraen con 4 ml de ácido tricloroacético al 10% a 4°C durante 48 horas.

El extracto se centrifuga y de la solución de tricloroacético se extrae el ácido por agitación de la misma con igual volumen de éter. La solución acuosa remanente, libre de ácido tricloroacético se liofiliza.

El sedimento remanente de la extracción con tricloroacético se lava con agua destilada 3 veces y se liofiliza. 0,9 mg del liofilizado se disuelven en Tampón de Tris-glicocola (pH 8,2) 1% de SDS y 0,5% de mercaptoetanol. En la misma forma se trata 1,3 mg del polisacárido y las soluciones se aplican a geles de poliacrilamida al 7%.

#### DETERMINACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS

Se utiliza el método de Lowry y col. (189). Para la determinación se toman alícuotas de suspensiones homogéneas de membranas, o de soluciones de membranas disueltas en SDS pero antes de agregar ditionito o iodoacetamida (que interfieren en la determinación).

Cuando se utilizan membranas liofilizadas se disuelven primero pesos conocidos del material en hidróxido de sodio 0.1 M durante 1-2 horas a temperatura ambiente antes de proceder a su determinación cuantitativa.

Alícuotas del material se llevan a 0,1 ml y se agrega 0,5 ml de agua destilada y 3 ml de la mezcla C (ver más adelante). Los tubos donde se realiza la reacción se mantienen 10 minutos a temperatura ambiente, y

se añade luego 0,3 ml de reactivo de Folin (diluido 1:1 con agua destilada) mezclando bien cada tubo. Después de 30 minutos, se determina la densidad óptica de cada solución leyendo a 750 nm. El testigo, contiene 0,6 ml de agua o tampón y los mismos reactivos. Como referencia se usa una solución de seroalbúmina bovina conteniendo 0,200 mg/ml.

Reactivo A: contiene 10 g de carbonato sódico en 100 ml de hidróxido de sodio al 0,1%.

Reactivo B: contiene 0,5% de sulfato de cobre en 1% de tartrato sódico y potásico.

Reactivo C: se prepara mezclando 50 ml de A con 1 ml de B.

Reactivo de Folin Ciocalteu: preparado como se indica a continuación.

Se mantiene a reflujo durante 10 horas una mezcla conteniendo 100 g de tungstato sódico, 25 g de molibdato sódico, 700 ml de agua, 50 ml de ácido fosfórico al 85% y 100 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se agrega luego 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua y algunas gotas de agua de bromo. Se hierve para eliminar el exceso de bromo, y se diluye finalmente a 1 litro. El reactivo no debe tener coloración verdosa. Se debe determinar su acidez por titulación con hidróxido sódico 1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

Las determinaciones de proteínas en este trabajo se realizaron utilizando este método. La presencia de SDS no interfiere en la determinación (255) pero otros componentes, como mercaptoetanol y EDTA, sí interfieren. Estos resultados fueron observados durante la realización de este trabajo y confirmados en otros laboratorios (256, 257). La forma de corregir el error introducido por los mismos es la de realizar la determinación antes de su adición, o en soluciones exhaustivamente dializadas.

También se ha informado que la presencia de hidratos de carbono interfieren en la determinación de proteínas con el método de Lowry y col. (258, 259, 260, 261). El contenido de azúcares en las membranas es variable de acuerdo a la membrana estudiada. No se realizan correcciones al respecto.

De los métodos posibles para la determinación de proteínas, este método resulta más rápido y, además, requiere menor concentración de material para el análisis. La determinación de  $N_2$ , que para este caso sería

la más recomendable, también estaría afectada por el error introducido por la presencia de ácidos nucleicos y fosfolípidos entre otros.

## ANALISIS DE ESPECTROS

Se realizaron las determinaciones de los espectros visibles y ultravioletas de soluciones de membrana R1 reducida con ditionito sódico, antes y después de la adición de iodoacetamida. Estos espectros se obtuvieron empleando el espectrofotómetro Cary, modelo 15.

El análisis de las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G-200 se realiza con un espectrofotómetro Gilford 2.400. La concentración de proteínas se determina midiendo la densidad óptica a 280 nm. El error en la determinación debido a la presencia de EDTA en las soluciones se corrige tomando como solución patrón la más próxima a la fracción considerada y en la que la absorción óptica es mínima.

El espectrofotómetro Perkins Elmer 457 se utiliza para la obtención de espectros de azúcares después de las reacciones de orcinol y cisteína. En algunos casos los espectros se repiten a las 48 horas.

## B) MATERIALES

Etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA) y laurilsulfato sódico (SDS) se obtuvieron de Fisher Scientific Co. El SDS se usó sin otra purificación, el procedente de otras marcas fue recrystalizado de alcohol en ebullición.

Toluidina, sal de Nitrosa-R, manosa, orcinol, clorhidrato de cisteína y ribosa se obtuvieron de BDH chemicals.

Glutation, Negro de Amido 10 B, fucsina básica, Sudan III, Tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS), y ácido ribonucleico (RNA) de levadura lote no. 701137818, fueron suministrados por los representantes de Merck.

Los tubos Visking para dialisis son de Scientific Instruments.

Ribonucleasa (RNasa) (EC 27.7.16) y deoxiribonucleasa (DNasa) (EC 3.14.15) de Koch y Light y BDH chemicals, respectivamente.

Lisozima (EC 3.6.1.3), y  $\alpha$ -iodoacetamida, se obtuvieron de Calbiochem.

La sal sódica del ácido p-cloromercuriobenzoico (PCMB) provino de Mann Research Lab.

Sephadex G-200 y G-25 y Azul dextrano fueron suministradas por Pharmacia Fine Chemicals Inc.

Acrilamida, N, N, N', N'-tetrametilendiamina, N, N'-metilenbisacrilamida, y persulfato de amonio proceden de Fluka y Buchs.

Los patrones de proteínas utilizados en la determinación de pesos moleculares fueron: pepsina, recrystalizada 3 veces de Nutritional Biochem, (P.M. 35.000), tripsina (P.M. 24.000) de Ferosa, seroalbúmina bovina de Sigma (el P.M. del monomero es 67.000), citocromo c (*Candida krusei*). recrystalizado dos veces proviene de Sankyo Co. (el P.M. es de 12.523), finalmente,  $\gamma$ -globulina plasmática se obtuvo de Hubber Lab.

Todos los reactivos no mencionados en esta lista son de grado analítico. Los solventes orgánicos como acetona, cloroformo, metanol, alcohol etílico, butanol, se usaron sin redestilar.

## RESULTADOS Y DISCUSION

SOLUBILIZACION DE MEMBRANA R1. EFECTO DEL pH. EXTRACCION DE LIPIDOS CON N-BUTANOL. EFECTO DEL pH Y LA IODOACETAMIDA EN LA RECUPERACION DE PROTEINAS SOLUBLES. DISTRIBUCION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS DE LA SOLUCION DE MEMBRANA R1 Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS.

Para este experimento se utilizan preparaciones de membrana R1 obtenidas tal como se indica en la sección de Métodos y Materiales. Primeramente se intenta obtener la máxima solubilización de la membrana. Como criterio de solubilización se adopta el procedimiento de determinar el contenido de proteínas. Se compara entonces el valor inicial de proteínas con el que se obtiene en el sedimento luego de centrifugar la solución inicial a 27.000 g.

La Tabla 1 muestra los resultados que se obtiene al emplear tampones neutros o ácidos. Se emplea el tampón de Tris-urea a pH 7,5 y acetato-urea a pH 5,2. Ambos tampones contienen además SDS en proporción de 4 mg/mg de proteínas. Las molaridades de los tampones están indicados en la tabla. Los resultados muestran que se obtiene mayor solubilización (mínimo sedimento) al emplear tampones ácidos.

La Figura 1 es el esquema del método que se adopta para extraer los lípidos y obtener el mayor rendimiento de proteínas en solución. La solución de membrana R1, se disuelve en el tampón de acetato sódico (0,05 M), y urea 0,5 M (pH 5,2) y se reduce con ditionito sódico. Se agregan luego concentraciones variables de iodoacetamida (a 27°C durante 10 minutos). Los lípidos se extraen con *n*-butanol a 4°C y se centrifuga. La aplicación del método, tal como se describe en el esquema y en la sección correspondiente, permite la obtención de dos fracciones acuosas solubles (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) y una interfase I.

TABLA 1

Membrana R1 mg Proteínas	pH	Sedimento mg Proteínas	Porcentaje de Solubilización
136,80	7,5	25	81,8
146,25	5,2	1	99,0

Solubilización de componentes de la membrana R1. Efecto del pH en la solubilización de proteínas. La membrana R1 se disuelve en tampón de Tris-ClH (0,05 M) y urea (0,5 M) (pH 7,5) y en acetato sódico (0,05 M) urea (0,5 M, pH 5,2). Se agrega a cada solución SDS en la proporción de 4 mg/mg de proteínas. Se centrifuga a 27.000 g durante 30 minutos. Los sedimentos se suspenden en agua. Se determina proteínas con el método de Lowry y col. El tanto por ciento solubilizado se determina en función del contenido de proteínas en el sedimento.

El estudio electroforético que se detalla más adelante, de las proteínas iniciales de la solución de membrana y las encontradas en las fracciones S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> e I indica que las dos últimas contienen prácticamente los mismos componentes y, por consiguiente, en casi todos los trabajos que se citan en esta tesis se indican como fracciones combinadas S<sub>2</sub> + I.

Para la elaboración de este esquema de fraccionamiento se han tenido en cuenta las siguientes consideraciones y evidencias experimentales.

Se ha indicado ya en la introducción y métodos que uno de los problemas principales de la metodología empleada en el estudio de los componentes de la membrana es la poca solubilidad de sus componentes. Una vez obtenidas las mejores condiciones para la solubilización de la membrana R1 interesa entonces la determinación y fraccionamiento de las proteínas libres de lípidos. El esquema de la Figura 1 es en realidad el resultado de la investigación inicial de las mejores condiciones para extraer los lípidos y lograr la máxima solubilización de las proteínas.

El efecto de los detergentes sobre las proteínas ha sido estudiado por diferentes autores. Se sabe así que la desnaturalización de las pro



teínas tiene lugar en grado variable. Los agregados insolubles se forman al dializar el detergente y favorecer la oxidación de los grupos tiólicos, que entonces forman proteínas de alto peso molecular (262). Los grupos tiólicos de la proteína nativa están naturalmente protegidos por la configuración espacial de la cadena peptídica. También se ha sugerido que los tioles son capaces de reaccionar con las cadenas no saturadas de los ácidos grasos (140). Estas reacciones son sensibles al efecto del pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. La presencia de menaquinonas y carotenos en membranas de *M. lysodeikticus* (263) indica la existencia de cadenas no saturadas. Cabe entonces preguntarse el papel que éstos desempeñan en el mantenimiento de las proteínas en la solución inicial.

Por otro lado, se indica que en la membrana sonicada de *M. lysodeikticus* (181) el 80% de las proteínas quedan en la interfase al extraer los lípidos con *n*-butanol. Si se consideran las interacciones inicialmente posibles (entre otras, las derivadas por la presencia del detergente y las tiolefinas lábiles) se comprende cual es el mecanismo de solubilización por SDS antes de la extracción con butanol. Al extraerse los lípidos con *n*-butanol, se romperían parte de estas interacciones. Las proteínas, que son tal vez bastante hidrofóbicas se quedarían esencialmente en la interfase, mientras que el SDS pasaría predominantemente a la fase acuosa. Se facilitaría entonces las condiciones para la formación de agregados de alto peso molecular si existieran grupos tiólicos en estas proteínas.

En algunos experimentos iniciales se observa que la interfase no se disuelve en tampones ácidos, pero se disuelve en parte al agregar mercaptoetanol (ver Tabla 2). Esto sugiere que la formación de agregados pueda tal vez evitarse con el agregado de iodoacetamida antes de la extracción de los lípidos. Se obtiene en esta forma el esquema finalmente adoptado e indicado en la Figura 1.

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos al solubilizar proteínas en ausencia de iodoacetamida, el agregado de mercaptoetanol para solubilizar la interfase, y la distribución de proteínas en las distintas fracciones. Cuando se añade iodoacetamida, se obtiene una solubilización del 95%. Estos resultados sugieren entonces la presencia de tioles en las proteínas de la membrana estudiada. En capítulos posteriores de este trabajo se presentan experimentos adicionales para determinar su existencia.

Membrana de *M. lysodeikticus* - Membrana R1

Disuelta con tampón de acetato-urea (pH 5,2).  
Se centrifuga 30 minutos a 27.000 g.

Sobrenadante  
se reduce con  $S_2O_4Na_2$  - Se agrega  
iodoacetamida incubando a 27°  
(10 min). Se extrae con n-butanol.  
(40% p/v) a 4°C agitando  
(20 min) y se centrifuga a  
10.000 g (10 min).

Sedimento  
(se desecha)

Interfase. Se suspende en 1/5 del vol. inicial  
con tampón conteniendo SDS al 1%.

Soluciones  
Sobrenadante fase orgánica  
(se desecha)  
Solución acuosa se re-  
pite la extracción con  
n-butanol 2 veces.

Soluciones  
Sobrenadante fase orgánica  
(se desecha)  
Solución acuosa  
(S<sub>1</sub>)

Interfase. Se suspende con la primera interfase.  
Las suspensiones conteniendo las interfases se ex-  
traen con n-butanol como se indica para el primer  
sobrenadante, se centrifuga a 10.000 g.

Soluciones  
Sobrenadante fase orgánica  
(se desecha)  
Solución acuosa  
(S<sub>2</sub>)  
Interfase  
(I)

La interfase I se suspende con S<sub>2</sub> y se dializa con tampón conteniendo 1% de SDS. En algunos casos se diali-  
zan independientemente. La solución acuosa S<sub>1</sub> se dializa con tampón 0,1% de SDS.

FIGURA 1.- Esquema del procedimiento empleado para solubilizar proteínas de membrana R1. Extracción de lípi-  
dos con n-butanol, y obtención de fracciones S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e I.

FIGURA 1

Esquema del procedimiento empleado para solubilizar proteínas de membrana R1. Extracción de lípidos con  
n-butanol, y obtención de fracciones S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e I.

TABLA 2

Iodoacet. Prot.	Proteínas en Membrana R1	Proteínas en Fracción S1	Proteínas en Fracción S2	Proteínas en Fracción I	Proteínas recuperadas	Tampón con 0,5 M Molaridad	Urea pH	SDS	Mercap- toeta- nol.				
mg/mg	mg	mg	mg	mg	mg			4mg/ /mg	0,5%				
---	41,6	4,90	11,7	6,9	16,5	no disuelta	11,8	28,3	acetato 0,02M	4,6	Si	No	
---	18,3	0,78	4,2	1,2	6,5	no disuelta	2,0	10,8	acetato 0,05M	5,2	Si	No	
---	70,0	8,6	12,2	1,7	2,4	14,3	20,4	24,6	35,1	acetato 0,05M	5,2	Si	Si
12,7	12,7	3,4	26,7	7,5	59,0	2,5	19,6	13,4	105,4	acetato 0,05M	5,2	Si	No
5,0	14,4	3,2	22,2	2,4	16,6	6,6	44,4	12,2	84,7	acetato 0,05M	5,2	Si	No
3,4	164,0	8,4	5,1	----	152(a)	92,6	160,4	97,8	acetato 0,05M	5,2	Si	No	
3,4	108,0	9,4	8,7	----	83(a)	76,6	91,5	85,5	Tris 0,05M	7,6	Si	No	

Efecto de iodoacetamida-mercaptoetanol y pH en el rendimiento de proteínas solubles de membranas R1 cuando se extraen lípidos con *n*-butanol. (a) Estos resultados corresponden a la suma de las fracciones S2 e I.

La Figura 2 representa la distribución electroforética de proteínas en la solución inicial de la membrana R1 y en las fracciones obtenidas de acuerdo al procedimiento indicado en la Figura 1. Los resultados presentados en la misma indican que en la membrana totalmente solubilizada (gel *a*) y antes de la extracción de lípidos se observan aproximadamente 10-11 bandas de proteínas. La fracción S<sub>1</sub> (gel *b*) contiene solamente las proteínas de la banda rápida (zona inferior del gel). La mayor parte de las proteínas se conservan en las Fracciones S<sub>2</sub> e I. De las proteínas inicialmente presentes, se nota la pérdida de concentración de las bandas intermedias, y una modificación en las velocidades de migración de las bandas rápidas (nótese dos en la porción inferior del gel) comparando las Fracciones S<sub>2</sub> e I de los geles *c* y *d*, con el gel *a* de la solución inicial.

También se analiza el trazado densitométrico correspondiente a la distribución de proteínas de estos geles. Los porcentajes correspondientes a cada área se determinan como se indica en la sección de Métodos y Materiales.

Los resultados expresados en las Figuras 3, 4 y 5 corresponden a los trazados densitométricos de las fracciones S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e I. Se observa así la presencia de cerca de 11 bandas en la fracción S<sub>2</sub> e I y muy pocas en la fracción S<sub>1</sub>. Cabe señalar que ninguna banda presenta una concentración mayor que el 30%, además algunas bandas están muy próximas sobre todo en la porción inferior del gel donde la definición es más problemática.

Los resultados de la Tabla 3 indican la movilidad relativa y la distribución relativa de una solución de membrana R1 (preparación no. I) disuelta en tampón de acetado 0.05 M y de urea 0.5 M (pH 5,2) con el agregado de SDS en una concentración de 4 mg/mg de proteína. Las preparaciones II y III son la misma solución de membrana pero reducida primero con ditionito sódico (preparaciones II y III que contienen 1,2 mg de ditionito por ml de solución) y acetilada luego con iodoacetamida (preparación III que contiene 12 mg de iodoacetamida por mg de proteína). Las condiciones de electroforesis en geles de poliacrilamida del 7% son las indicadas en Materiales y Métodos. Como puede observarse en la solución de membrana reducida con ditionito, el efecto aparente parece disminuir la concentración de la banda 5 con aumento de las concentracio-

TABLA 3

Membrana	NUMERO DE BANDAS																	
	1 - 2		3		4		5		6		7		8		9		10	
	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%	a	%
I	0,39	2,1	0,43	1,2	0,56	3,5	0,67	15,4	0,78	12,4	0,88	28,0	0,92	15,4	1,00	21,4	-	----
II	0,41	3,8	0,50	3,1	0,61	8,3	0,70	3,4	0,82	15,6	0,91	24,2	0,94	14,3	1,00	27,3	-	----
III	0,41	2,2	0,42	1,4	0,50	2,7	0,59	11,5	0,71	21,5	0,80	6,4	0,88	14,0	0,95	12,7	1	27,1

Efecto de la edición de ditionito de sodio y iodoacetamida en la distribución electroforética de proteínas de membrana R1. Preparación n° I es la membrana R1 disuelta en tampón de acetato y urea conteniendo SDS (pH 5,2). Preparación n° II es la anterior reducida con ditionito de sodio. Preparación n° III es la anterior (II) acetilada con iodoacetamida en proporción de 12 mg/mg de protefna. Los valores de la movilidad relativa  $\alpha$  y el porcentaje de las bandas se deducen de los trazados densitométricos de los geles correspondientes.

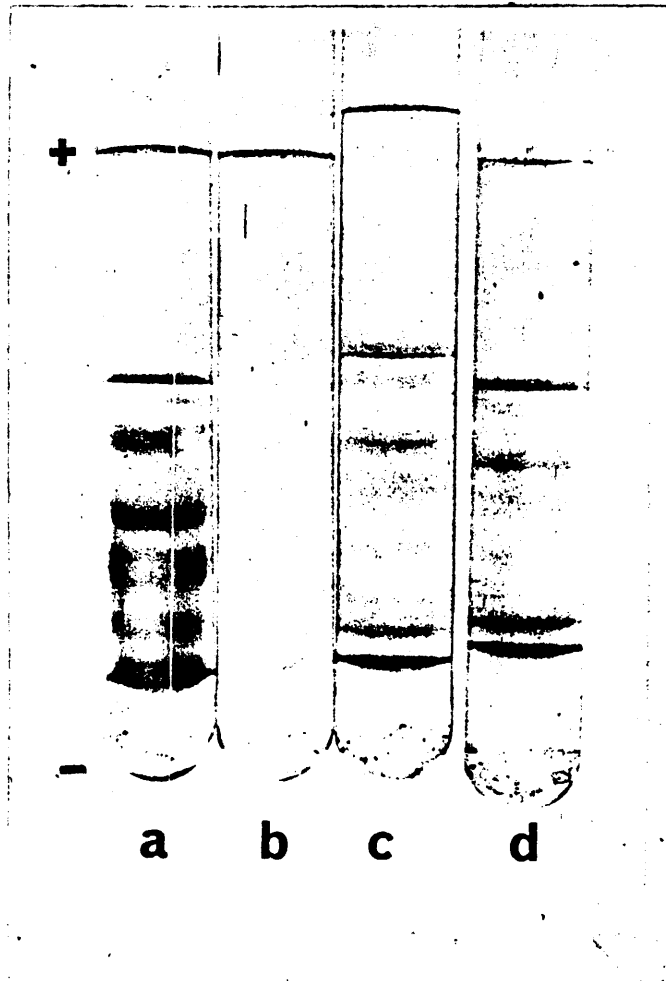


FIGURA 2

Distribución electroforética de proteínas en membrana R1 y fracciones  $S_1$ ,  $S_2$  e I, (ver texto). El gel *a* contiene 0,230 mg de proteínas de la solución de membrana R1. El gel *b* contiene 0,026 mg de proteínas de la fracción  $S_1$ , y los geles *c* y *d*, contienen 0,104 mg de proteínas de las fracciones  $S_2$  e I. Para la electroforesis se emplean geles de poliacrilamida al 7% con tampón Tris-glicina conteniendo SDS al 0,1% (ver Métodos).

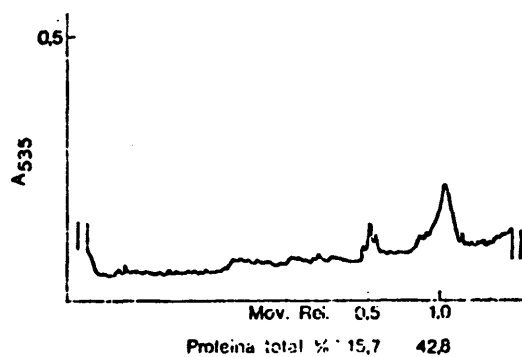


FIGURA 3

Trazado densitométrico del análisis por electroforesis de la fracción S<sub>1</sub> de membrana R1.

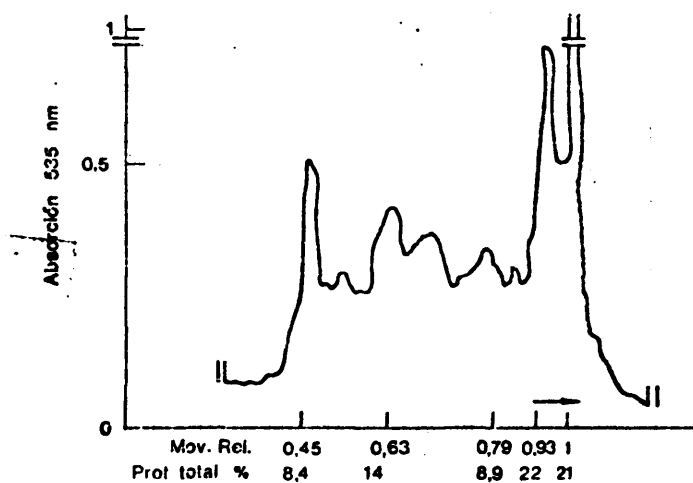


FIGURA 4

Trazado densitométrico del análisis electroforético correspondiente a la fracción S<sub>2</sub> de la membrana R1 extraída con *n*-butanol.

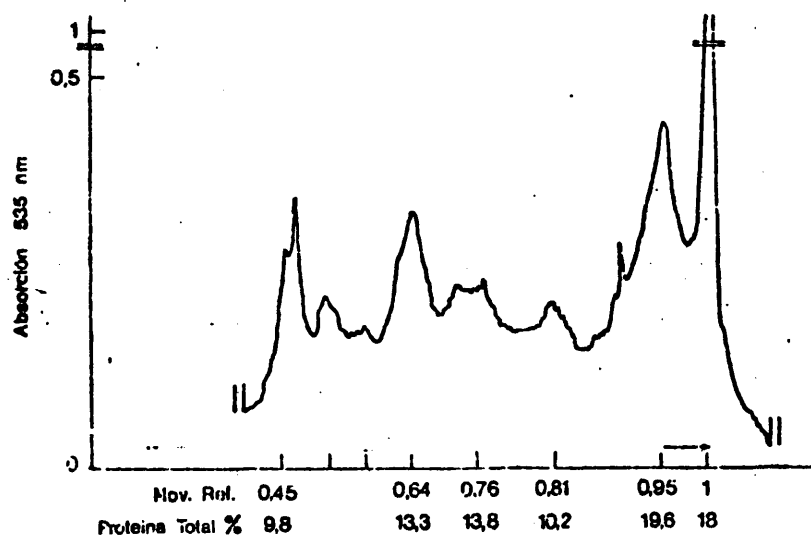


FIGURA 5

Trazado densitométrico del análisis electroforético correspondiente a la fracción I de la membrana R1 extraída con *n*-butanol.

nes correspondientes a las bandas más lentas. Además, parece modificarse ligeramente la concentración de la banda más rápida. En la membrana acetilada puede verse un aumento del número total de bandas de 9 a 10. El efecto de la reducción sugiere que en la solución reducida con ditionito se produce esencialmente modificaciones de la concentración de una banda, que parece polimerizarse en agregados de mayor peso molecular y menor velocidad relativa. En la acetilación, por el contrario, y como puede esperarse, se evita la formación de agregados y, por consiguiente, se aumenta la concentración y migración hacia la región inferior del gel. En este análisis, se asume que la intensidad de coloración es proporcional a la concentración de proteínas, suposición que puede ser discutible.

El método de coloración de proteínas empleado, utiliza el Negro de Amido 10-B (4-4 diamino-difenilamion-diazotato sódico) que puede reaccionar por su carácter ácido más intensamente con las proteínas básicas por ejemplo. Tampoco se sabe el efecto de este colorante cuando reacciona con proteínas de alto contenido de polisacáridos.

Por consiguiente, estos resultados se consideran como tentativos. Más aún, los geles empleados son cortos y, tal vez, el desplazamiento no ha sido suficiente para permitir una óptima separación de los componentes, especialmente en la sección inferior del gel.

Los resultados calculados en la Tabla 3 se originan de los trazados densitométricos de los geles respectivos representados en las Figuras 6, 7 y 8 que corresponden a las preparaciones I, II y III.

#### DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE GRUPOS SH. APLICACION A SEROALBUMINA BOVINA, SEROALBUMINA BOVINA REDUCIDA Y A SOLUCION DE MEMBRANA R1

La composición de aminoácidos de diferentes orígenes, como eritrocitos (264, 265, 266, 267), membrana sarcotubular (268), membrana de mitocondria (269), membrana plasmática de ameba (270) y retículo endoplasmático de rata (271), entre otros se caracterizan por su contenido de aminoácidos hidrófobos y bajo contenido de cistina o cisteína. Sin embargo, la composición depende de la fracción estudiada (28). El contenido de hidratos de carbono en estas fracciones o membranas estudiadas es varia



ble (del 4 al 64%, ver revisión de Ref. 28) y recientemente se ha informado la presencia de un glicopéptido conteniendo triglicossilcisteína (272). La presencia de grupos SH en membranas de eritrocitos (273) parece estar relacionada con el transporte de azúcares entre otros, además, están distribuidos a través del espesor de la membrana. Más aún, casi todos los métodos empleados para solubilizar proteínas y/o su análisis electroforético incluyen la presencia de mercaptoetanol (274, 275, 276, 277, 278). La obtención de proteínas insolubles al extraer lípidos de la membrana R1 con *n*-butanol, que se solubilizaban por adición de iodoacetamida, sugirió la necesidad de determinar si efectivamente existen o no grupos SH en la membrana.

Se utilizó el método de Boyer (235) para la titulación de grupos SH. Como autocontrol del método, se aplicó primero a una solución de seroalbúmina bovina, ajustándolo hasta la obtención de valores similares a los encontrados en la literatura (279, 280). La elección de seroalbúmina se basa en que contiene de 0,75 a 0,98 moles de SH por mol de proteínas. También se aplicó la determinación a la solución de seroalbúmina reducida como se indica en Métodos. Los resultados de la titulación se muestran en las Tablas 4 y 5. Las Figuras 9 y 10 son los trazados gráficos de estas titulaciones y en los cuales se determina el punto de la concentración equivalente. Los resultados muestran que el valor obtenido para la titulación directa de la muestra, está de acuerdo con los de la literatura.

A pesar de todos los cuidados tomados para la determinación de grupos SH totales en la solución de seroalbúmina reducida, el mejor valor obtenido es de 26 moles, que representa un 77,7% del valor encontrado en la literatura (281). Como en las condiciones experimentales empleadas no se reprodujeron los valores encontrados en la literatura, la técnica no fue aplicada para la determinación total de grupos SH en membrana R1 de *M. lysodeikticus*.

La titulación espectrofotométrica se aplicó en cambio a la solución de membrana R1, sin previa reducción, para la determinación de grupos SH libres.

Alícuotas de solución de membrana R1 obtenida como se describe en la sección de Métodos correspondiente (5 mg de proteínas por ml de solución) se titulan dentro de las 24 horas de su obtención. La solución de

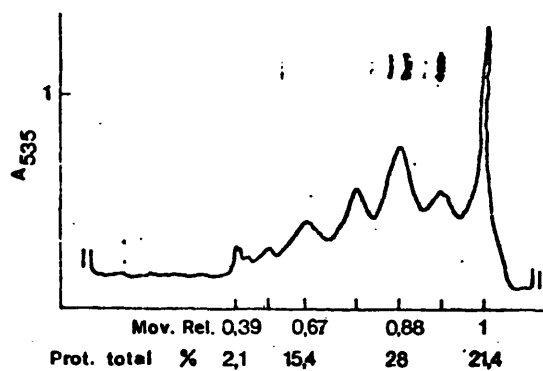


FIGURA 6

Distribución electroforética de proteínas y trazado densitométrico de la preparación n° I. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% conteniendo 0,1% de SDS. Inicialmente se aplican 0,125 mg de proteínas.

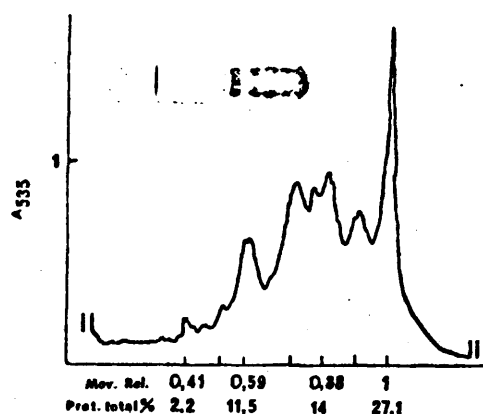


FIGURA 7

Distribución electroforética de proteínas y trazado densitométrico de la preparación n° II. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% conteniendo 0,1% de SDS. Inicialmente se aplican 0,125 mg de proteínas.

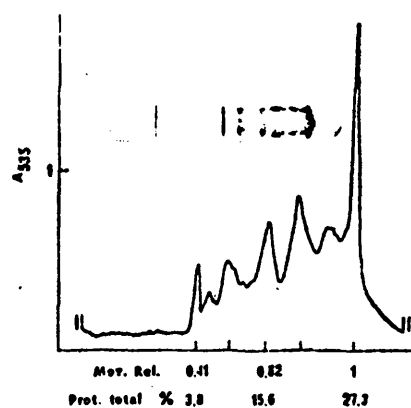


FIGURA 8

Distribución electroforética de proteínas y trazado densitométrico de la preparación n° III. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% conteniendo 0,1% de SDS. Inicialmente se aplican 0,125 mg de proteínas.

TABLA 4

Muestra $\mu\text{l}$	abs. muestra $\Delta\text{D}_{0255}$	$\Delta\text{D}_{0255}$	$\Delta\text{D}_{0255}$	Promedio 255
0	0	0,130	0,130	0,130
50	0,035	0,174	0,176	0,175
100	0,044	0,207	0,212	0,210
150	0,071	0,244	0,247	0,245
200	0,092	0,244	0,239	0,241
250	0,115	0,245	0,244	0,248
300	0,139	0,245	0,244	0,244
350	0,169	0,242	0,237	0,239

Titulación de grupos SH en albúmina bovina. 50 mg de seroalbúmina bovina se titulan con 3 ml de PCMB. Alícuotas (50  $\mu\text{l}$  se agregan a 3 ml de la solución titulada ( $3,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) de PCMB y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de absorción sustraídos de la absorción del blanco (proteína) y corregidos del factor de dilución se indican en la 3a y 4a, columna. El promedio de dos determinaciones es el que se indica en el gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,145 ml e indica la presencia de 0,91 moles de SH por mol de seroalbúmina.

TABLA 5

Muestra $\mu$ l	abs. muestra $\Delta D_{255}$	$\Delta D_{255}$	$\Delta D_{255}$	Promedio A255
0	0	0,187	0,186	0,187
20	0,017	0,295	0,296	0,272
40	0,037	0,364	0,349	0,356
60	0,037	0,466	0,452	0,458
80	0,045	0,563	0,544	0,553
100	0,067	0,638	0,618	0,628
120	0,078	0,731	0,699	0,715
140	0,089	0,795	0,783	0,789
160	0,098	0,804	0,791	0,797
180	0,101	0,803	0,791	0,797
200	0,110	0,809	0,788	0,798

Titulación de grupos SH en seroalbúmina bovina reducida, (ver texto). Alícuotas de muestra se agregan a 3 ml de PCMB titulado ( $7,85 \times 10^{-5}$  M) y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de la absorción, sustraídos del blanco (proteína) y corregidos del factor de dilución se indican en la 3a y 4a, columna. El promedio de las dos determinaciones se usa en la construcción del gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,135 ml. La solución contiene 4,2 mg de albúmina reducida y se titulan 28,6 moles de SH por mol de proteína.

membranas hasta el momento de su análisis se conserva en tubos tapados en los cuales se ha burbujeado  $N_2$  durante algunos minutos. Los resultados de la titulación en diversas preparaciones de membrana R1 se expresan en las Tablas 6, 7 y 8 cuyos gráficos correspondientes son los de las Figuras 11, 12 y 13. También se hacen determinaciones de los grupos SH de la membrana R1 reducida con ditionito sódico, y en la misma solución una semana después de conservar la muestra a  $4^\circ C$ . Los resultados de las Tablas 9 y 10 son los de ambas titulaciones cuyas gráficas respectivas se presentan en las Figuras 14 y 15. Los resultados indican que la solución de membrana R1 contiene un promedio de 25 moles de SH/ $10^5$  gramos de proteínas, este valor aumenta a 45 moles por reducción con ditionito. La conservación en nevera durante una semana reduce el número titulado a 29 moles.

## EFFECTOS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IODOACETAMIDA EN LA SOLUBILIZACION DE PROTEINAS DE MEMBRANAS R1

### A - MIGRACION ELECTROFORETICA Y MOVILIDAD RELATIVA DE PROTEINAS EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE IODOACETAMIDA

De los resultados mencionados en la Tabla 2, se deduce que la presencia de iodoacetamida aumenta la solubilidad de las proteínas de la membrana R1, cuando se extraen los lípidos con *n*-butanol. En este capítulo se estudia el efecto de las diferentes concentraciones de iodoacetamida en la migración electroforética de las mismas.

La Figura 16 indica la migración electroforética de soluciones de membrana R1 reducidas con ditionito sódico y acetiladas con diferentes concentraciones de iodoacetamida. El gel *a* corresponden a la distribución de proteínas de la solución reducida de la membrana (prep. IV). Los geles *b*, *c* y *d* corresponden a las soluciones acetiladas conteniendo iodoacetamida en relaciones de 0,76, 3,75 y 7,6 mg/mg de proteína. Las muestras fueron aplicadas a los geles en las soluciones conteniendo los excesos de reactivos (ditionito e iodoacetamida). Los geles *e*, *f* y *g* corresponden a las soluciones de membrana acetilada con las mismas concentraciones que las anteriormente indicadas y en el mismo orden, pero fueron aplicadas al gel luego de eliminar el exceso de reactivos por cromatografía.

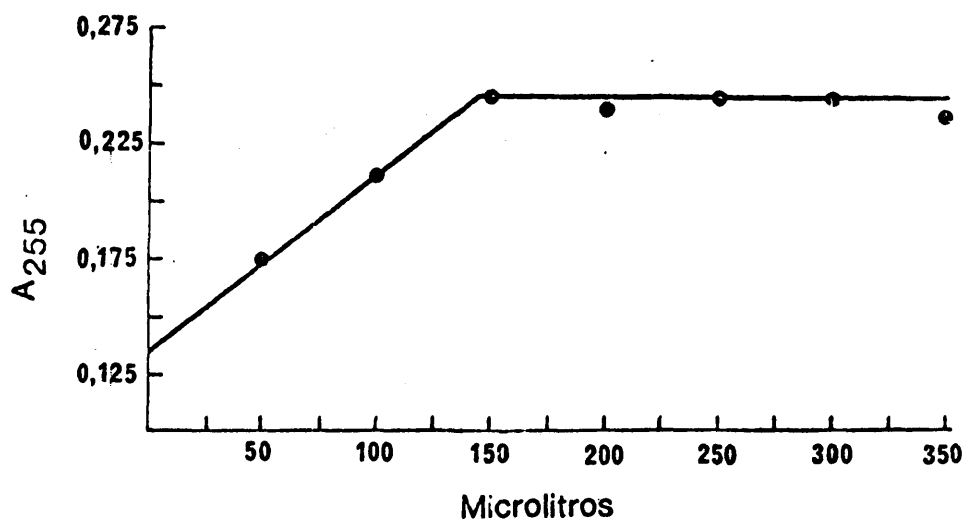


FIGURA 9

Titulación espectrofotométrica de grupos SH en seroalbúmina bovina.  
Corresponde a la Tabla 4.

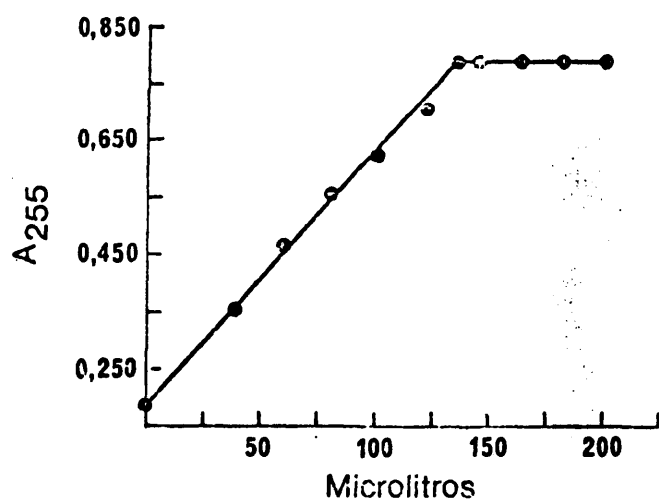


FIGURA 10

Titulación espectrofotométrica de grupos SH en seroalbúmina bovina.  
Corresponde a la Tabla 5.

TABLA 6

Muestra ul	abs. muestra $\Delta D_{255}$	$\Delta D_{255}$	$\Delta D_{255}$	Promedio $A_{255}$
0	0	0,220	0,220	0,220
20	0,108	0,219	0,217	0,218
40	0,203	0,243	0,232	0,237
60	0,305	0,261	0,246	0,253
80	0,407	0,261	0,254	0,257
100	0,509	0,280	0,260	0,273
120	0,606	0,287	0,278	0,282
140	0,702	0,297	0,280	0,286
160	0,804	0,299	0,290	0,294
180	0,905	0,313	0,293	0,303
200	1,006	0,320	0,314	0,317
220	1,097	0,332	0,319	0,325
240	1,197	0,338	0,330	0,334
260	1,293	0,338	0,330	0,334
280	1,400	0,336	0,332	0,334

Titulación de grupos SH en solución de membrana R1. Alícuotas de solución de membrana correspondientes a una solución de 5 mg/ml de proteínas se disuelven en tampón de acetato y urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. Las alícuotas indicadas en la primera columna se agregan a 3 ml de PCMB  $8,5 \times 10^{-5} M$ , y se lee el cambio de absorción a 255 nm. Los valores de absorción sustraídos de la absorción de la muestra y corregidos por el factor de dilución se indican en la 3a y 4a columna. El promedio de las dos determinaciones se utiliza para la construcción del gráfico. El punto de intersección es de 0,229 m y corresponde a 22,2 moles de SH por  $10^5$  g de las proteínas.

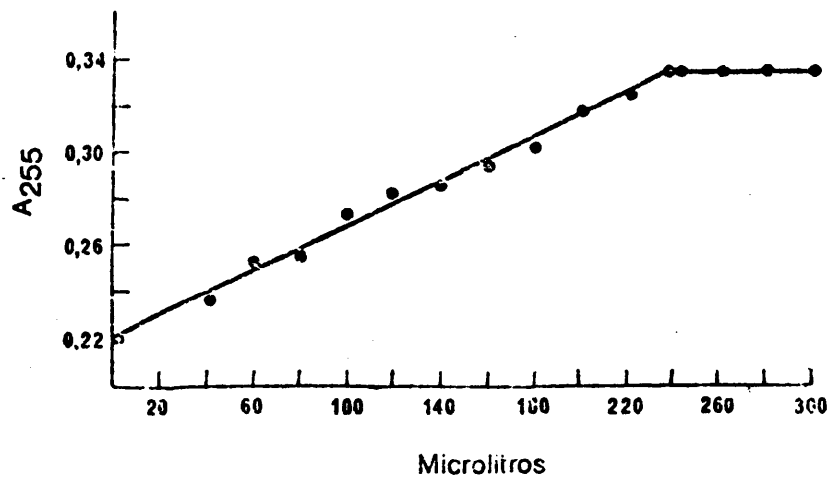


FIGURA 11

Titulación espectrofotométrica de grupos SH de membrana R1. Corresponde a la Tabla 6.

TABLA 7

Muestra ml	abs. muestra $\Delta A_{255}$	$\Delta A_{255}$	$\Delta A_{255}$	Promedio $A_{255}$
0	0	0,243	0,243	0,243
20	0,153	0,254	0,254	0,254
40	0,316	0,250	0,256	0,253
60	0,469	0,257	0,271	0,264
80	0,627	0,271	0,272	0,271
100	0,783	0,282	0,282	0,282
120	0,923	0,302	0,307	0,304
140	1,087	0,294	0,297	0,295
160	1,245	0,294	0,297	0,295
180	1,392	0,294	0,297	0,295

Titulación de grupos de SH en solución de membrana R1. Alícuotas de la solución de membrana conteniendo 5,7 mg/ml de proteína, se disuelven en tampón de acetato y urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. Las alícuotas indicadas en la primera columna se agregan a 3 ml de PCMB  $7,7 \times 10^{-5} M$  y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de la absorción sustraídos de la absorción de la muestra y corregidos del factor de dilución se indican en la 3a y 4a columna. El promedio de las dos determinaciones se usa en la construcción del gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,160 ml y corresponde a 25,2 moles de SH asumiendo un peso molecular aparente de 105 para las proteínas en la solución.

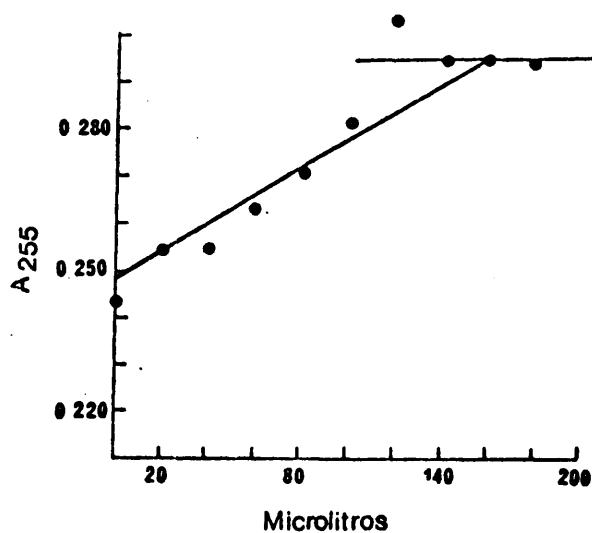


FIGURA 12

Titulación espectrofotométrica de grupos SH de la membrana R1. Corresponde a la Tabla 7.



TABLA 8

Muestra ul	abs. muestra $\Delta O_{255}$	$\Delta O_{255}$	$\Delta O_{255}$	Promedio $A_{255}$
0	0	0,220	0,220	0,220
20	0,254	0,234	0,234	0,234
40	0,625	0,236	0,250	0,243
60	0,970	0,248	0,270	0,259
80	1,280	0,258	0,276	0,265
100	1,540	0,272	0,272	0,272
120	1,820	0,272	0,272	0,272
140	2,351	0,262	0,270	0,266
160	2,700	0,266	0,272	0,269

Titulación de grupos de SH en solución de membrana R1. Alícuotas en la solución de membrana conteniendo 8,9 mg/ml de proteínas, se disuelven en tampón de acetato y urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. Las alícuotas indicadas en la primera columna se agregan a 3 ml de PCMB  $6,6 \times 10^{-5}$  M y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de absorción sustraídos de la absorción de la muestra y corregidos del factor de dilución se indican en la 3a y 4a columna. El promedio de las dos determinaciones se usa en la construcción del gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,080 ml y corresponde a 27,7 moles de SH asumiendo un peso molecular aparente de  $10^5$  para las proteínas de la solución.

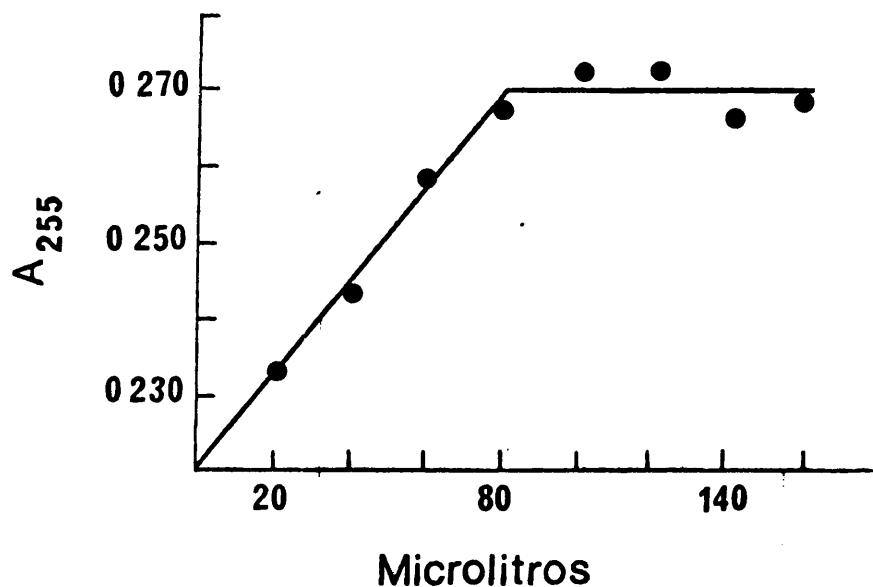


FIGURA 13

Titulación espectrofotométrica de grupos SH de membrana R1. Corresponde a la Tabla 8.

TABLA 9

Muestra μl	abs. muestra ΔO <sub>255</sub>	ΔO <sub>255</sub>	Promedio A <sub>255</sub>
0	0,013	0,255	0,242
20	0,120	0,411	0,276
40	0,355	0,667	0,319
60	0,499	0,865	0,359
80	0,668	1,052	0,381
100	0,844	1,239	0,395
120	1,007	1,422	0,418
140	1,161	1,580	0,423
160	1,329	1,730	0,408
180	1,483	1,882	0,409

Titulación de grupos SH de membrana R1. Alícuotas de la solución de membrana conteniendo 5,1 mg/ml de proteínas y reducida con ditionito sódico se disuelven en tampón de acetato y urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. Las alícuotas indicadas en la primera columna se agregan a 3 ml de PCMB  $7,7 \times 10^{-5}$  M y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de absorción sustraídos de la absorción de la muestra y corregidos del factor de dilución se indican en la cuarta columna. Estos valores se utilizan para la ejecución del gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,098 ml y corresponde a un valor de 45 moles de SH asumiendo un peso molecular aparente de 105 para las proteínas de la solución.

TABLA 10

Muestra μl	abs. muestra ΔO <sub>255</sub>	ΔO <sub>255</sub>	ΔO <sub>255</sub>	Promedio A <sub>255</sub>
0	0	0,317	0,313	0,314
20	0,152	0,367	0,358	0,363
40	0,327	0,343	0,348	0,345
60	0,503	0,354	0,349	0,352
80	0,650	0,358	0,359	0,359
100	0,794	0,356	0,375	0,366
120	0,954	0,365	0,375	0,370
140	1,098	0,365	0,386	0,375
160	1,242	0,376	0,405	0,390
180	1,385	0,387	0,409	0,399
200	1,531	0,406	0,405	0,406
220	1,687	0,389	0,400	0,394

Titulación de grupos SH en membrana R1. Alícuotas de la solución de membrana conteniendo 5,2 mg/ml de proteína y reducida con ditionito de sodio fue conservada a 4°C durante una semana. La solución se preparó en tampón de acetato de urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. Las alícuotas indicadas en la primera columna se agregan a 3 ml de PCMB  $9,03 \times 10^{-5}$  M y se lee el cambio de absorción a 255 nm de la formación del complejo. Los valores de absorción sustraídos de la absorción de la muestra y corregidos del factor de dilución se indican en la tercera y cuarta columnas. El promedio de las dos determinaciones se usa en la construcción del gráfico. El punto de equivalencia corresponde a 0,180 ml y corresponde a un valor de 29 moles de SH asumiendo un peso molecular de 105 para las proteínas de la solución.

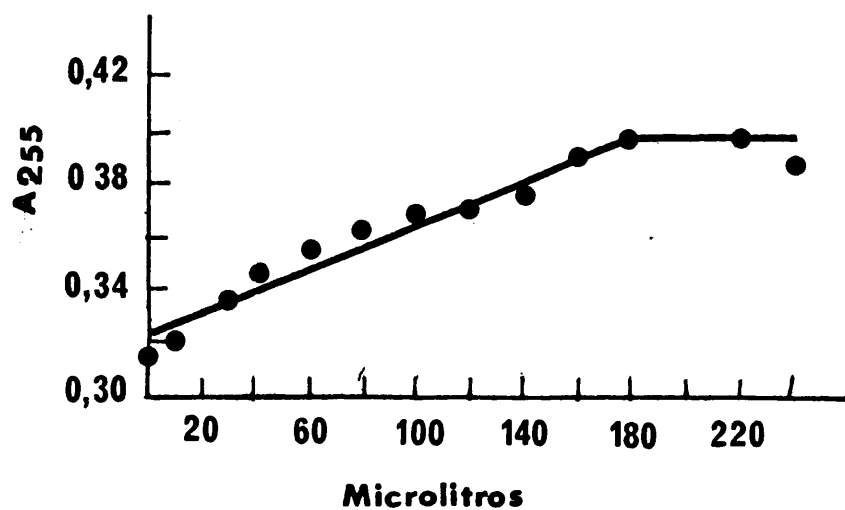


FIGURA 14

Titulación espectrofotométrica de grupos SH de membrana R1 reducida con ditionito de sodio. Corresponde a la Tabla 9.

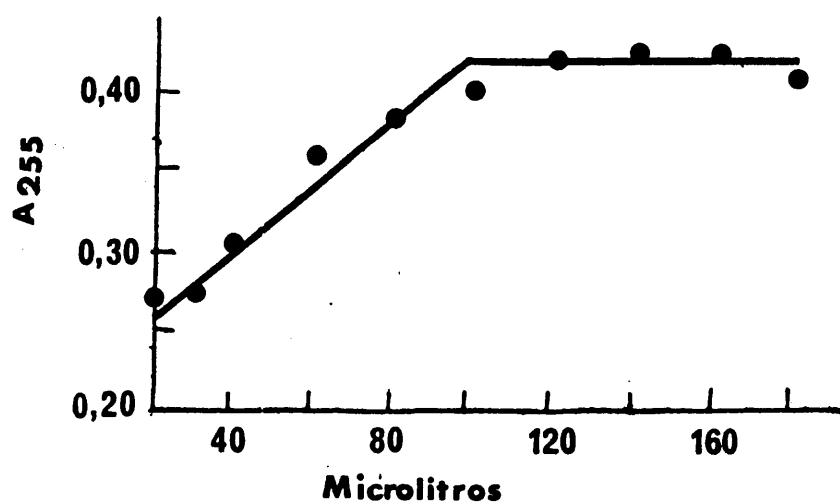


FIGURA 15

Titulación espectrofotométrica de grupos SH de membrana R1 reducida con ditionito de sodio y conservada una semana a 4°C. Corresponde a la Tabla 10.

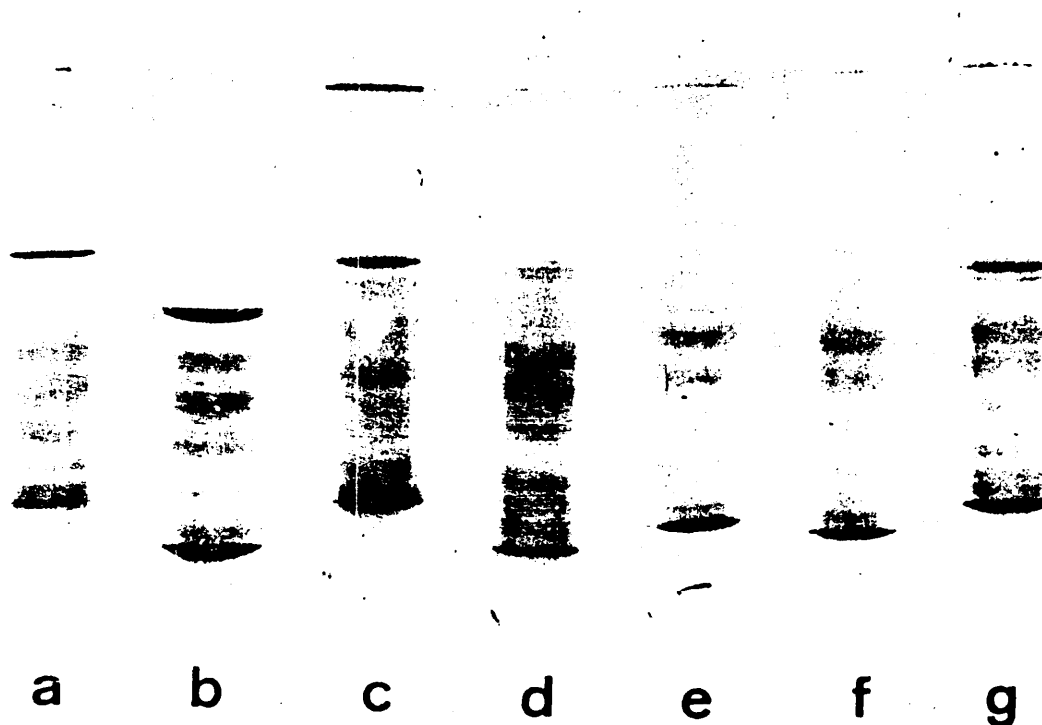


FIGURA 16

Efecto del agregado de iodoacetamina en la distribución electroforética de proteínas de la membrana R1. Gel *a* es la solución de membrana reducida con ditionito de sodio en tampón de acetato urea (pH 5,2) y SDS (4 mg/mg de proteína). Geles *b*, *c*, *d*, las muestras se trataron con las siguientes concentraciones de iodoacetamida: 0,76/1; 3,75/1 y 7,6/1 en mg/mg de proteína respectivamente. Geles *e*, *f* y *g*, se separa el exceso de reactivos pasando las muestras por resina de Sephadex G-25 antes de aplicar las muestras al gel.

TABLA II

Membrana R1 preparada	NUMERO DE BANDAS																								
	1-2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		
	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	a	z	
IV	0,40	8,9	0,50	5,0	0,55	5,8	0,64	14,1	0,74	19,0	0,84	15,4	0,93	7,9	1,00	15,5									
V	0,48	4,1	0,50	3,9	0,57	3,9	0,71	10,2	0,80	20,0	0,82	14,0	0,89	13,4	1,00	34,0									
IV-1	0,49	14,1	0,58	16,8	0,67	17,3	0,78	17,2	0,84	8,9	0,94	12,0	0,95	5,7	1,00	13,1									
IV-2	0,50	5,2	0,52	2,9	0,56	5,1	0,67	19,3	0,76	9,0	0,85	2,2	0,89	17,4	0,93	7,2	1,00	23,0							
IV-3	0,36	3,7	0,40	5,8	0,55	6,5	0,57	6,2	0,66	20,0	0,74	11,4	0,85	16,8	0,90	17,0	0,96	7,2	1,00	10,8					
IV-1a	0,32	2,2	0,36	2,2	0,40	3,2	0,45	4,7	0,48	15,0	0,69	3,5	0,71	3,2	0,80	10,2	0,87	10,0	0,94	7,1	0,97	7	1	15,6	
IV-2a	0,39	7,5	0,55	5,0	0,62	4,7	0,66	5,1	0,68	10,8	0,78	30,8	0,87	13,1	0,94	10,4	0,96	6,5	0,97	6,5	1,00	6			
IV-3a	0,43	2,5	0,45	3,7	0,57	6,9	0,61	9,4	0,65	17,2	0,76	11,4	0,87	9,5	0,91	6,3	0,94	6,2	1,00	12,4					

Movilidad y por ciento de distribución de proteínas de membrana fraccionada por electroforesis. Las soluciones de membrana R1 en tampón de acetato urea (pH 5,2) conteniendo SDS (4 mg/mg protefna). Para las preparaciones V y IV reducidas con ditionito de sodio. Las preparaciones IV-1, IV-2 y IV-3 contienen 0,76; 3,75 y 17,6 mg de iodoacetamida por mg de protefna. Las electroforesis se realizaron sin extraer el exceso de reactivos de estas muestras. Las preparaciones IV-1a, IV-2a y IV-3a, son las correspondientes a IV-1, IV-2 y IV-3 en las que el exceso de reactivos se elimina por cromatografía en Sephadex G-25. Electroforesis en gels de poliacrilamida al 7% y tampón con SDS al 0,1%.

tografía en columna de Sephadex G-25. Apparently se observa una variación en la intensidad de algunas bandas cuyo análisis se detalla con los resultados de la Tabla 11.

La Tabla 11 indica la distribución electroforética de bandas de dos preparaciones de membrana R1 disueltas en tampón de acetato-urea (pH 5,2), SDS (4 mg/mg de proteína) y reducidas con ditionito sódico. Si se compara la movilidad de las preparaciones con la indicada en la Tabla 3 (preparación II), se observa que para la preparación IV, la concentración de las mismas no es semejante, aumentándose las más lentas (¿desdoblamiento de la banda n° 7 con formación de agregados de menor velocidad relativa?). En la preparación V se observa, en cambio, aumento de la concentración de las bandas rápidas (¿poca resolución del gel?). La solución I se examina inmediatamente después de la obtención de la membrana, la solución IV se analiza la vez que las soluciones reducidas y acetiladas IV-1, IV-2 y IV-3 una semana después. La diferencia observada sugiere la existencia de proteínas reducibles con ditionito y capaces de formar agregados de menor velocidad en función del tiempo. La variación de las concentraciones de tioles libres indicada en el capítulo precedente puede ser considerada como explicación en este caso. Las soluciones IV-1, IV-2 y IV-3, son las preparaciones obtenidas al agregar a la IV inicial iodoacetamida en proporciones variables de 0,76, 3,75 y 7,6 respectivamente. Estas soluciones se aplican a los geles indicados en la Figura 16 (b, c y d) sin eliminar el exceso de reactivo. El resultado del análisis densitométrico indica que si bien se observa un aumento en el número de bandas, también se observan modificaciones en las concentraciones de iodoacetamida. También modifica el número cuando el exceso de reactivos se elimina por cromatografía en columna de Sephadex G-25 (Figuras 17, 18 y 19), así, se observan de 9 a 13 bandas comparando IV-1 y IV-1a, de 10 a 12 comparando IV-2 y IV-2a. En este último caso, puede observarse la reducción de concentración de proteínas en la banda n° 5; y modificaciones variables en las restantes.

Los resultados sugieren que condiciones como el tiempo de reducción de la muestra, la presencia de exceso de reactivos y/o la coloración selectiva de proteínas modificadas por la reducción y acetilación, son importantes en la determinación del número de bandas y sus concentraciones.

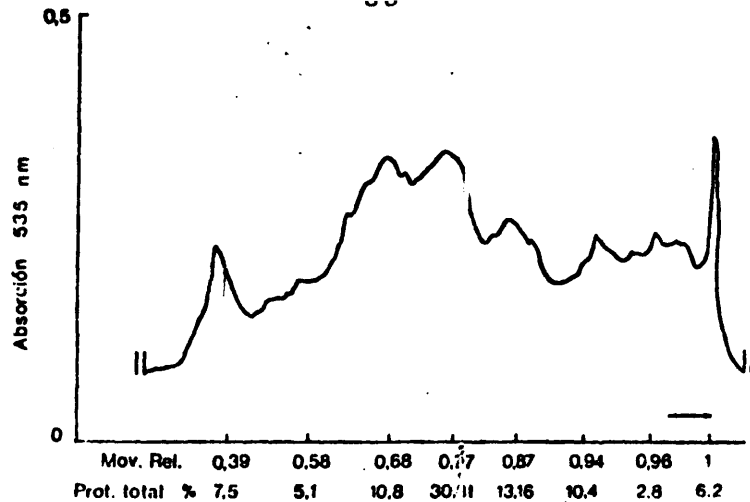


FIGURA 17

Trazado densitométrico de la distribución electroforética de proteínas de la solución reducida y acetilada de la membrana R1. Corresponde al gel e de la Figura 16.

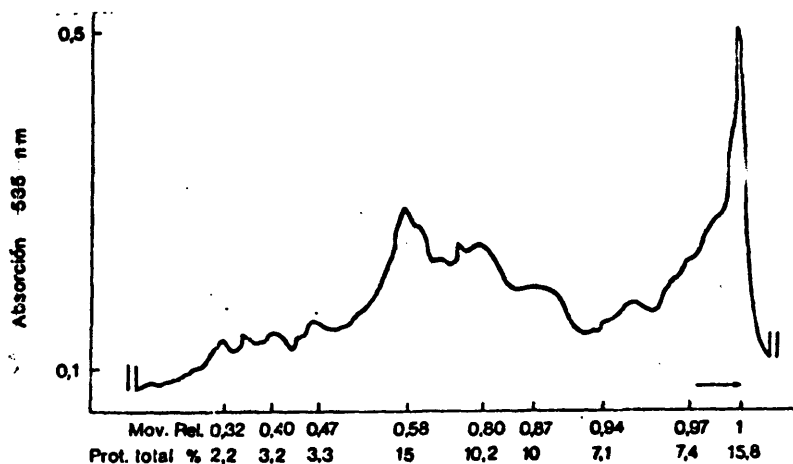


FIGURA 18

Trazado densitométrico de la distribución electroforética de proteínas de la solución reducida y acetilada de membrana R1. Corresponde al gel f de la Figura 16.

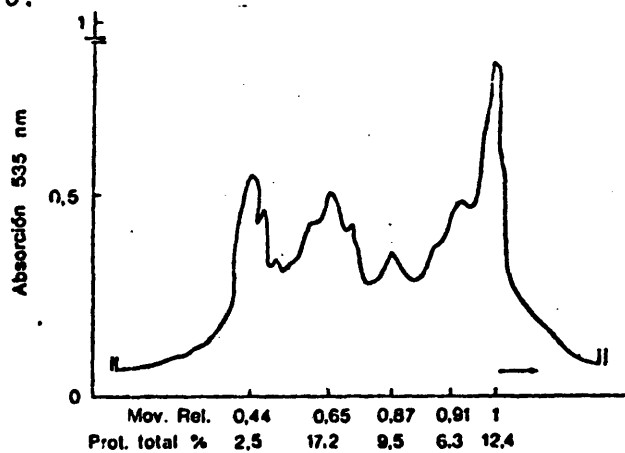


FIGURA 19

Trazado densitométrico de la distribución electroforética de proteínas de la solución reducida y acetilada de la membrana R1. Corresponde al gel g de la Figura 16.

No se han realizado en esta tesis otros estudios más específicos sobre la variabilidad de estas condiciones de trabajo. Sin embargo, existe información bibliográfica indicando que si la concentración de SDS empleada es suficiente para desnaturalizar las proteínas, las variaciones de reactividad de las mismas en función de grupos reducibles permite la formación de agregados, con los cuales podrían explicarse parte de estos resultados.

La formación de agregados durante la electroforesis ha sido considerada por otros autores y se reseña en la discusión de metodología correspondiente a las determinaciones de peso molecular de las proteínas.

En secciones de esta tesis se discute el efecto de la presencia posible de componentes de cadenas de hidrocarburos no saturadas sobre proteínas oxidables, especialmente las menaquinonas y carotenos de la membrana de *M. lysodeikticus*. Como estos lípidos migran a mayor velocidad que la banda indicadora de electroforesis, en nuestras condiciones experimentales se puede facilitar la posibilidad de formación de agregados de las proteínas reducidas no acetiladas.

Además, la presencia de electrolitos (las muestras no se dializan contra el tampón de electroforesis) y tal vez la longitud empleada de los geles, justifiquen estos resultados.

Existe en general la idea de que las proteínas residuales de la membrana se caracterizan por un bajo contenido de cistina y cisteína, (ver revisión en Ref. 28). Algunos de estos bajos valores, sin embargo, fueron obtenidos en soluciones de membranas solubilizadas con iones de diferentes concentraciones. Tampoco se observa en estos análisis estudios del tiempo de hidrólisis de las mismas en presencia de hidratos de carbono que pudieran ser extraídos al mismo tiempo.

En los estudios clásicos de análisis de aminoácidos se encuentra que cuando se analiza cistina y cisteína en presencia de azúcares, se destruye hasta el 20% de los mismos (282).

Además, nuestros resultados en el análisis de proteínas solubilizadas de la membrana R1 indican un aumento de la recuperación de proteínas en la solución libre de lípidos, cuando la extracción de los mismos se realiza a partir de la solución reducida y acetilada con iodoacetamida (como puede observarse de los resultados en la Tabla 2).

Es cierto que el pH de acetilación empleado en este trabajo no es el



más favorable, ya que se recomienda la alquilación a pH alcalino (283, 284). En la ribonucleasa se observa, por ejemplo, que se acetilan los residuos de histidina, lisina y metionina en condiciones variables de pH y de tiempos de reacción. En condiciones de pH bajos, se alquila la metionina, y a pH 5,5 los grupos  $\alpha$  amino de la histidina (285, 286). Si esto ocurriera, ya que la histidina es un componente aunque no mayoritario de las proteínas de membranas (sialoglicoproteínas de eritrocitos (287) y citocromos (27)) y siendo, además, hidrófobo, su alquilación podría servir también para interpretar la solubilización de las proteínas de membrana R1.

Si esta interpretación fuera correcta, se plantea el interrogante de cual es la reacción del PCMB con la solución de proteínas empleadas en estas titulaciones. Si se acepta que la determinación es debida al mercáptido formado, los resultados obtenidos indican entonces la presencia de grupos libres de SH. La alquilación de los mismos serviría para explicar el aumento de concentración de proteínas solubles observados en las soluciones de la membrana estudiada.

Además, el análisis de resultados de la Tabla 12, soporta la existencia de grupos SH libres. Especialmente, en las proteínas correspondientes a las bandas intermedias del gel, que parecen ser sensibles a los agentes reductores y a la iodoacetamida.

#### B - ABSORCIÓN VISIBLE Y ULTRAVIOLETA DE SOLUCIONES DE LA MEMBRANA R1. EFECTO DE LA PRESENCIA DE IODOACETAMIDA

La identificación de algunos componentes de la membrana tipo y de una membrana residual de *M. lysodeikticus* estudiados en este trabajo ha sido realizada anteriormente (127, 163, 169). Estudios en la membrana tipo, indican la presencia de citocromos (168, 288). El contenido total de lípidos (165, 166) indica la presencia de ácidos grasos saturados de cadena ramificada y describe además la presencia de menaquinonas y carotenos (263). El análisis espectrofotométrico de estos últimos se realiza luego de extraerlos con isooctano.

En la membrana residual (169) (similar a la R1) se menciona la presencia de citocromos y se observa además que la relación de lípidos a proteínas se mantiene constante.

TABLA 12

Membrana R1 (mg/ml)	Iodoacetamida.	LONGITUD DE ONDA PARA LOS MAXIMOS DE ABSORCION											
		469,8		471		440,4		440,5		440,6		413	
		DO	A/mg	DO	A/mg	DO	A/mg	DO	A/mg	DO	A/mg	DO	A/mg
0,470	---	0,452	0,960	---	---	---	---	---	---	0,500	1,060	0,395	0,840
0,060	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0,960	1,8	0,620	0,645	---	---	---	---	0,665	0,692	---	---	0,510	0,531
0,074	1,8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
0,610	7,6	---	---	0,520	0,585	0,574	0,940	---	---	---	---	0,434	0,710
0,102	7,6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
												1,245	12,200

Efecto del agregado de Iodoacetamida en la absorción y la absorción específica (A/mg = absorción/mg de proteínas) de la solución reducida de membrana R1. La membrana se disuelve en tampón de acetato y urea (pH 4,6) conteniendo 2,5% de SDS. La solución de referencia es el tampón con SDS, ditonito y/o Iodoacetamida. La concentración de Iodoacetamida indicada está expresada en mg de Iodoacetamida por mg de proteína.

Como en este trabajo se consiguió la total solubilización de la membrana R1, resultó interesante el estudio espectrofotométrico de sus componentes.

Se presentan en esta sección los espectros visibles y ultravioletas de preparaciones de membrana R1 solubilizada, y de la misma solución cuando se añade iodoacetamida. Los análisis se realizan reduciendo la solución de membrana R1 (disuelta en tampón de acetato-urea, pH 4,6 y SDS 4 mg/ml de proteínas) con ditionito sódico 1 mg/ml de solución inmediatamente antes del análisis.

Los resultados de la Figura 20, presentan el espectro visible y ultravioleta de la solución de membrana R1. En la Figura 21, se presentan los espectros de la misma preparación acetilada con 8 mg de iodoacetamida/mg de proteínas. El análisis de las figuras se realiza en conjunto con los datos resultantes presentados en la Tabla 12.

Las concentraciones de proteínas se determinan con el método de Lowry y col., antes de la adición de los reactivos.

Los resultados de la Tabla 12 ilustran máximos de absorción observados en las figuras anteriores. Los espectros observados son el resultado de los componentes presentes (citocromos  $b_{560}$ ,  $c_{550}$  y  $a_{601}$ ; 168, 288 y 289), ubiquinonas, carotenos (263) y otros como proteínas y ácidos nucleicos. Los citocromos presentan las bandas características de absorción entre 600 a 350 nm, mientras que en soluciones de isooctano, los carotenos y menaquinonas absorben entre 350 y 240 nm.

La curva del espectro visible de la membrana R1 presentan máximos similares a los observados por Salton (168) para la membrana tipo pero con mínimos más pronunciados, con la absorción entre 500 a 600 nm es prácticamente ausente. Si esta modificación en el espectro se debe a la pérdida por solubilización de algunos componentes al obtenerse la membrana residual (por ejemplo, pérdida de citocromos  $b_{560}$ ,  $c_{550}$  o  $a_{601}$ ) no ha sido investigado más profundamente.

Se observa, además, que el efecto de acetilar las proteínas parece ser el de inducir un ligero desplazamiento de absorción de los máximos de 469,8 y 440,6 nm sin modificar la absorción a 413 nm.

El máximo de absorción en el espectro ultravioleta (263 nm) es diferente del observado en membranas de eritrocitos (15, 290) o mitocondrias (291), y puede estar relacionado con la presencia en esta membra-

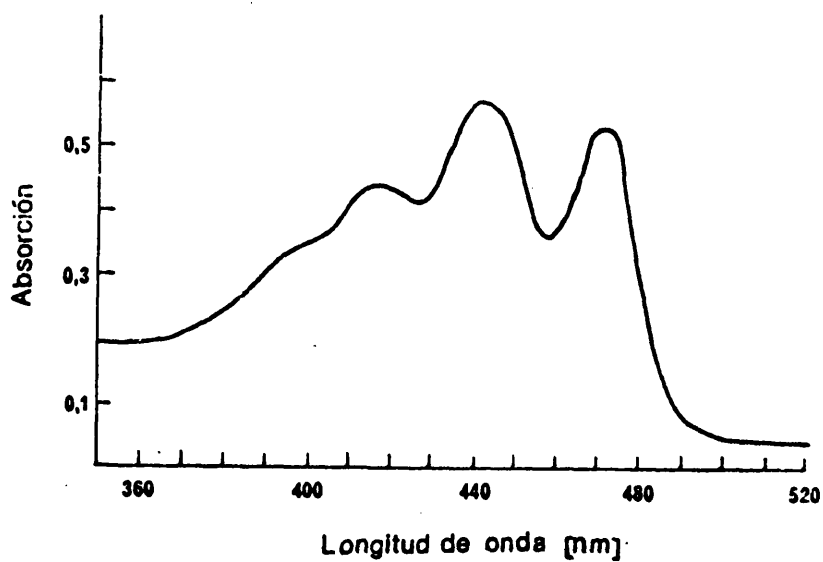
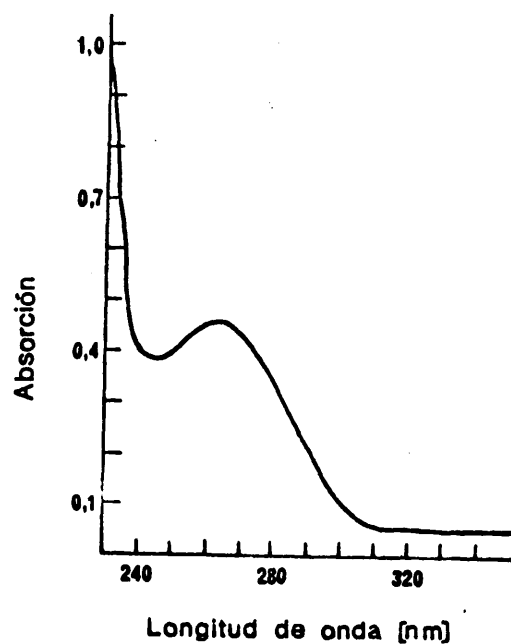


FIGURA 20

Espectro ultravioleta y visible de la solución de membrana R1. La solución inicial de membrana contiene 5,2 mg de proteínas por ml, y se reduce con ditionito sódico (1,2 mg/ml). Para el análisis, se realizan diluciones adecuadas.

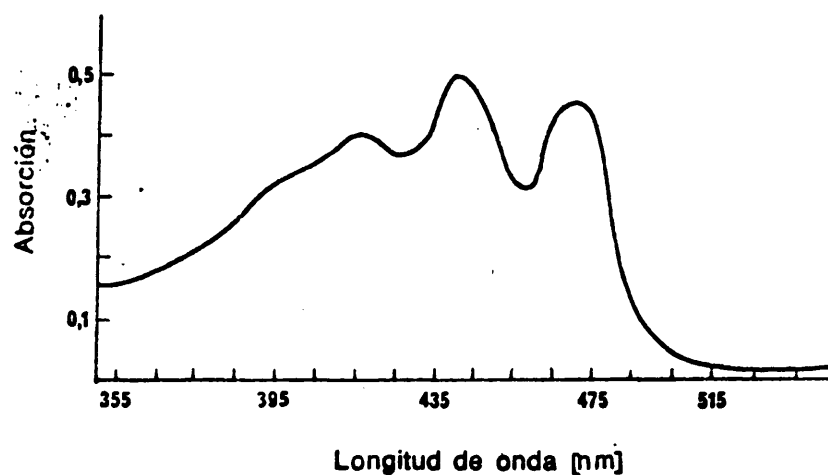
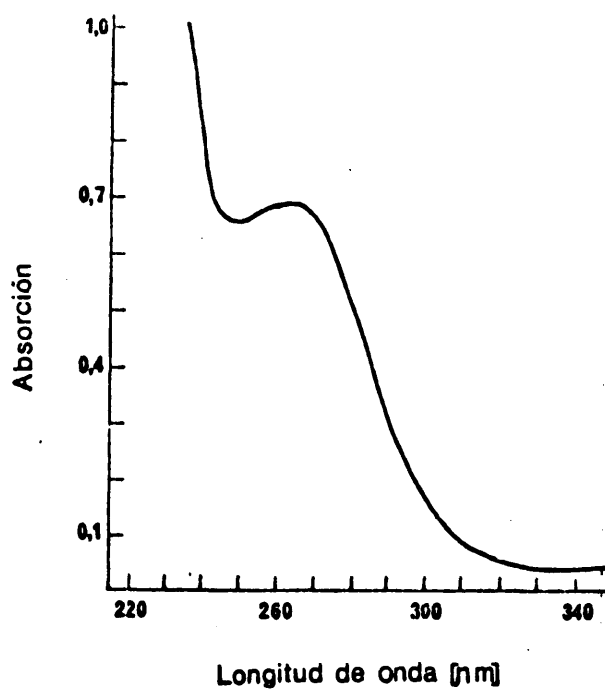


FIGURA 21

Espectro ultravioleta y visible de membrana R1 reducida con ditionito y alquilada con iodoacetamida. La solución inicial de membrana contiene 5,2 mg de proteínas por ml, se reduce con ditionito sódico (1,2 mg/ml), y se acetila con iodoacetamida (8 mg/mg de proteína). Para el análisis se realizan diluciones adecuadas.

na de material nucleotídico. La presencia de iodoacetamida parece modificar la absorción específica sugiriendo modificaciones de las proteínas presentes (alquilación de lisina, metionina, cisteína, histidina y/o con cambios de estructura), o modificaciones de las interacciones posibles entre carotenos y menaquinonas presentes y los grupos SH de las proteínas reducidas, que ya han sido discutidas.

#### DETERMINACION ELECTROFORETICA Y PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS SOLUBLES PRESENTES EN LA FRACCION $S_2 + I$ DE LA MEMBRANA R1

La distribución de pesos moleculares en función de la movilidad relativa para las proteínas de la fracción  $S_2 + I$  se obtuvo usando geles de poliacrilamida al 7% conteniendo SDS al 0,1% solamente, como se describe en la sección de Métodos y Materiales.

La Tabla 13 indica la movilidad relativa y los logaritmos de los pesos moleculares para proteínas utilizadas como referencia. La Figura 22 es el gráfico correspondiente utilizado para la determinación de los pesos moleculares de las fracciones identificadas en la muestra. Los resultados indican que la banda más rápida tiene un peso molecular de  $17.8 \times 10^3$ . No se observa la presencia de fracciones mayores que  $74 \times 10^3$ . Estos valores son menores que los encontrados de membrana de eritrocitos ( $200 \times 10^3$ ) (292) y miofibrillas ( $105 \times 10^3$ ) (293), pero similar a la distribución de pesos moleculares en *Escherichia coli* que es de  $7.5 \times 10^3$  además de dos bandas de  $91 \times 10^3$  y  $110 \times 10^3$  (294).

Aún cuando el método es muy útil para la determinación de pesos moleculares de proteínas y péptidos, en algunos casos se observaron desviaciones del comportamiento esperado. Así, en las glicoproteínas con alta concentración de azúcares se observa que la interacción de las mismas con el SDS (interacción en la que depende la movilidad observada) no es proporcional a su cadena y, por consiguiente, la movilidad no es función solamente de su peso molecular (293). Proteínas como aldolasa, seroalbúmina-bovina,  $\alpha$ -quimotripsinógeno entre otros, se comportan en forma esperada no sólo a una concentración de poliacrilamida sino en varias concentraciones, dando en todos los casos líneas rectas. Como se verá más adelante, se identifican en esta fracción analizada tres ban-

das de azúcares en la región inferior del gel, por consiguiente, los pesos calculados en esa región son sólo tentativos.

## FRACCIONAMIENTO POR CRIBA MOLECULAR DE PROTEINAS Y RNA. APLICACION A LA SOLUCION DE MEMBRANA R1

Para esta separación se utiliza una resina de Sephadex G-200 equilibrada con bicarbonato de amonio 0,05 M, EDTA 0,005 M y SDS al 1%.

Se estudia el fraccionamiento de la solución S<sub>2</sub> + I obtenida al extraer los lípidos de la membrana R1 como se indica en el esquema de la Figura 1. Se aplican a la columna 11 mg de proteínas (15,4 unidades ópticas de absorción a 180 nm) recogiendo fracciones de 2,5 ml. La elución de proteínas se sigue midiendo la absorción óptica de cada fracción a 280 nm y 260 nm. El rendimiento medido por la recuperación de las unidades ópticas iniciales es del 93 al 97%. La presencia de EDTA interfiere en la determinación óptica y en la determinación colorimétrica de proteínas. En la determinación óptica, sin embargo, es posible corregirla tomando como patrón la más próxima a la fracción considerada y en que la absorción óptica, es mínima. La migración electroforética de las fracciones individuales se inserta en la Figura 23.

Como se ve, aún cuando por el análisis de la absorción óptica no se obtiene un fraccionamiento de proteínas, el análisis electroforético indica la separación de proteínas de pesos moleculares altos, intermedios y bajos.

La fracción eluida entre los tubos 170 y 210, se analiza electroforéticamente mientras que la coloración para proteínas es muy débil; se colorea con toluidina. Por su absorción óptica se deduce que debe contener ácidos nucleicos ya que presenta una relación de absorción  $A_{260}/A_{280} = 1,4$ .

La presencia de otros componentes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas conteniendo hierro y ácidos nucleicos) en la fracción S<sub>2</sub> + I y en las soluciones obtenidas en el fraccionamiento anterior se estudia a continuación.

En la Figura 24 se presenta el contenido de los componentes antes mencionados. En el gel a se identifican proteínas coloreadas con Negro de Amido, y las bandas observables son de color violáceo. El gel b se

TABLA 13

Materia	Mov. relativa	PM	Log. PM
$\gamma$ -Globulina	0,16	(160.000)	2,50
	0,08	(160.000)	2,83
Seroalbúmina Bovina	0,25	(66.000) <sub>4</sub>	2,42
	0,37	(66.000) <sub>3</sub>	2,30
	0,41	(66.000) <sub>2</sub>	2,12
	0,64	60.000	1,87
Pepsina	0,93	35.500	1,54
Tripsina	0,97	23.800	1,39
Citocromo C	1,04	12.523	1,09
Deshidrogenasa láctica	0,98	35.000	1,54

Movilidad relativa de proteínas en geles de poliacrilamida al 7% y tampon de SDS al 0,1%. Los valores indicados son promedios de 2 o más determinaciones.

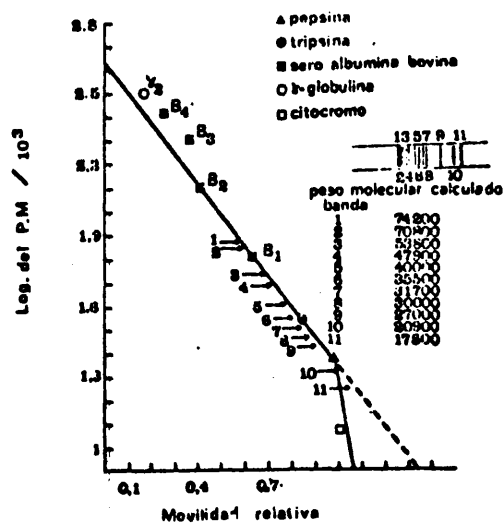


FIGURA 22

Gráfica del logaritmo de los pesos moleculares de proteínas y su movilidad relativa. Se inserta la distribución electroforética de proteínas fracción S<sub>2</sub> + 1. Cálculo de sus pesos moleculares. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% y 0,1% de SDS.



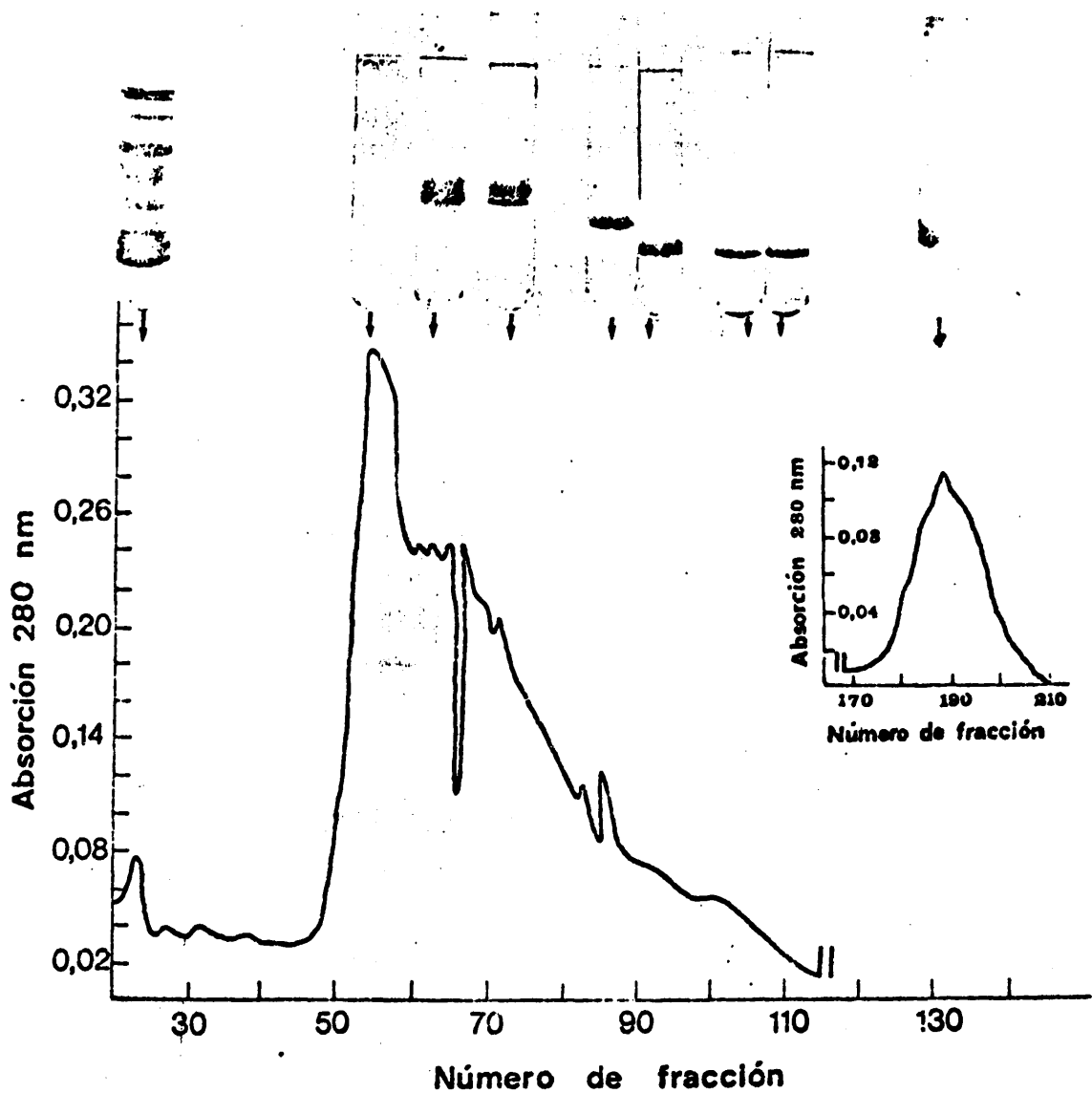


FIGURA 23

Fraccionamiento de componentes de la fracción  $S_2 + 1$  de la solución de membrana R1. Identificación electroforética de proteínas correspondientes a la fracción indicada por la flecha. Se inserta además la última fracción eluida que en electroforesis se colorea con toluidina. La representación se inicia a partir del volumen de exclusión ( $v_0$ ).

colorea con toluidina y las bandas son de color azul. El gel *c* se colorea con Sudan III, y la banda es de color naranja. En el gel *d* se identifican hidratos de carbono y las bandas son de color rojo. El gel *e* se colorea con Sal de Nitrosa-R y la banda es de color verdoso. Esta última reacción indica la presencia de una proteína conteniendo hierro. Por debajo de esta banda la zona opaca no corresponde a la reacción y es una falacia fotográfica. Como es de esperar, los colores indicados para las diferentes reacciones no se reproducen en la fotografía en blanco y negro.

Los resultados de la Figura 24 indican la presencia de dos bandas coloreadas con la reacción de toluidina, una superior y otra inferior (gel *b*). La superior no corresponde a ninguna banda de proteína, y la inferior ancha y difusa, puede ser múltiple. La coloración de lípidos empleada en el gel *c*, es el primer método descrito para la identificación de los mismos (ver Métodos y Materiales) y da una sola banda naranja en la sección inferior del gel. La coloración para hidratos de carbono en el gel *d*, indica la presencia de dos bandas, una fina y otra ancha más rápida. Esta última puede tal vez relacionarse con la identificada en el gel *b* (parte inferior). Si se compara con el gel *a*, se observa que no hay proteínas. Este resultado puede deberse a tres posibles razones: 1) el colorante es malo para colorear proteínas muy ácidos, 2) el material es una glicoproteína que se colorea mal con el Negro de Amido, 3) el material separado en esta zona no es una proteína sino un polisacárido y/o ácidos nucleicos.

Las reacciones específicas observadas en la sección inferior de los geles donde el fraccionamiento de proteínas es problemático, son de difícil interpretación.

La aplicación, sin embargo, de estos métodos de coloración a secciones individuales del fraccionamiento con la columna de Sephadex suministran los resultados indicados a continuación. La proteína conteniendo hierro se eluye en la fracción 83. Los lípidos se eluyen entre las fracciones 83 a 106, superponiéndose a los hidratos de carbono presentes en las fracciones 86 a 99. También se detectan hidratos de carbono en concentrados de fracciones combinadas eluidas posteriormente. La reacción de toluidina indica la presencia de dos bandas en las fracciones 83 a 106, pero fracciones combinadas entre los tubos 184 a 196 una vez con-

centradas, resultan como una banda difusa rápida similar a la observada en la muestra inicial. Esta banda se identifica tentativamente como ácidos nucleicos en base a las propiedades antes mencionadas y sugiere la presencia de los mismos en la membrana R1, hallazgo que no se esperaba.

La presencia de las dos bandas coloreadas con toluidina en la muestra inicial y su fraccionamiento de la columna, puede interpretarse como debida al menos a dos tipos de ácido ribonucleico. El ácido ribonucleico de bajo peso molecular (banda inferior) que también se colorea con fucsina puede ser t-RNA. Este RNA puede considerarse presente tal vez al mismo tiempo que las glicoproteínas eluidas entre las fracciones 86-99. La presencia de proteínas se observa solamente en los geles obtenidos de fracciones concentradas entre los números indicados.

La presencia de una sola banda nítida para la reacción de hierro, parece estar en contradicción con los varios tipos de citocromos observados en membranas tipo de *M. lysodeikticus* por otros autores. El resultado puede deberse a la incapacidad de resolver proteínas con esos pesos moleculares en las condiciones empleadas o en la pérdida de algunos al obtener la membrana residual R1.

También resulta interesante la presencia de lípidos eluidos entre varias fracciones de la columna de Sephadex. Su presencia indica que la extracción con *n*-butanol es incompleta, y sugiere una forma de unión a las proteínas muy intensa a pesar de la presencia de 1% de SDS en el tampón empleado durante el fraccionamiento. La presencia de lípidos en zonas coloreadas con Negro de Amido y con fucsina, así como su presencia en idénticas fracciones eluidas de la columna, sugiere la presencia de glicoproteínas o glicolípidos o ambos en la muestra analizada. No se descarta, sin embargo, la posibilidad de que se trate de lípidos tan fuertemente unidos a proteínas, que en las condiciones de este trabajo son aún inseparables.

#### ESTIMACION DE RIBOSA, FOSFORO Y HEXOSAS EN LA SOLUCION DE MEMBRANA R1 EXTRAIDA CON N-BUTANOL. EFECTO DEL pH

Los resultados de los experimentos anteriores (fraccionamiento en columna de Sephadex G-200, estudios espectrofotométricos y (electroforéticos), sugieren la presencia de hidratos de carbono en la fracción S<sub>2</sub>+I analizada.

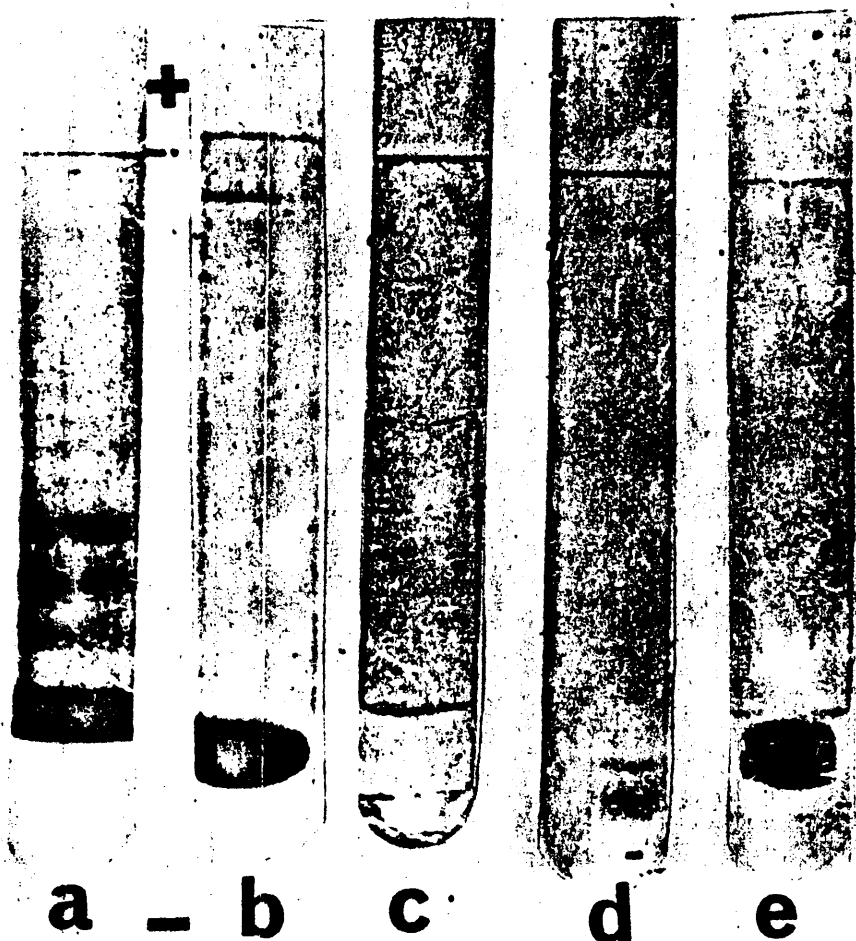


FIGURA 24

Identificación electroforética de componentes en la fracción  $S_2 + 1$ . El gel *a* se colorea con Negro de Amido (proteínas). Los geles *b*, *c*, *d* y *e* se colorean con: toluidina (ácidos nucleicos y/o polisacáridos), Sudan III (lípidos), oxidación con ácido perióico y fucsina (hidratos de carbono) y Sal de Nitrosa-R (coloración de hierro). Para el análisis se aplican 0,052 mg de proteínas. Las soluciones están disueltas en el tampón empleado para su fraccionamiento en la columna de Sephadex G-200. La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida al 7% y tampón de Tris-glicocola conteniendo SDS al 0,1%. Las reacciones, si bien son de diferentes colores, no se aprecian en la fotografía.

En esta sección se estudia al efecto del pH en los componentes remanentes de la extracción de lípidos con *n*-butanol.

Soluciones de membrana R1 solubilizada con tampones de acetato (0,05 M pH 5,2) y Tris Cl H 0,05 M (pH 7,5) conteniendo SDS (4 mg/mg de proteína) y urea (0,05 M) se reducen con ditionito sódico y se acetilan con iodoacetamida. Los lípidos se extraen con *n*-butanol como se indica en la Figura 1, manteniendo los pH respectivos. Se analiza el contenido de ribosa, fósforo y hexosas. Para la determinación cuantitativa de ribosa, se emplea el método de orcinol, y para su análisis espectrofotométrico, la reacción de sulfúrico-cisteína, ambas detalladas en Métodos y Materiales.

Los resultados de la Tabla 14, indican un mayor contenido de ribosa en la fracción S<sub>1</sub> solubilizada empleando pH de 5,2. Este valor es el 77% del contenido en la solución inicial de membrana. En medio neutro se extrae, en cambio, sólo el 31% en esta fracción. La fracción S<sub>2</sub> + I contiene solamente el 17% y varía levemente con el pH. Estos resultados sugieren que componentes conteniendo ribosa se extraen con los lípidos.

El tratamiento disminuye como es de esperar la concentración de fósforo determinado en las fracciones S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> + I, sin anularlos completamente.

La concentración de hexosas determinada parece aumentar para la fracción S<sub>2</sub> + I cuando la extracción se realiza a pH ácido.

En estas determinaciones iniciales no se esperaba encontrar ribosa (241) ya que su presencia indica la existencia de nucleótidos, o RNA. Los valores encontrados para la membrana tipo eran solamente del 1 al 2%, (104), expresado como RNA. La presencia de fósforo en ambas fracciones luego de extraer lípidos confirma además la presencia posible de los mismos.

La ribosa fue además comprobada espectrofotométricamente por el método de Dische para pentosas. La Figura 25 representa los espectros de soluciones patrones de ribosa, glucosa y manosa.

La Figura 26, contiene los espectros correspondientes a las soluciones de S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> + I analizadas con el mismo método. Para la determinación cuantitativa se presentan sólo los datos empleando el método del orcinol, que se describe en la sección de Métodos.

TABLA 14

pH	Solución inicial	Fracción S <sub>1</sub>	Fracción S <sub>2</sub> + I	Solución inicial	Fracción S <sub>1</sub>	Fracción S <sub>2</sub> + I	Fracción S <sub>1</sub>	Fracción S <sub>2</sub> + I
					Contenido de Hexosas			
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
7,6	6,14	0,80	1,10	14,4	0,34	0,46	4,40	2,50
5,6	8,96	6,10	0,81	11,8	2,56	0,41	5,80	4,50

Efecto del pH en la distribución de ribosa, fósforo y hexosas en las fracciones S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> + I de membrana R1 libre de lípidos por extracción con *n*-butanol.

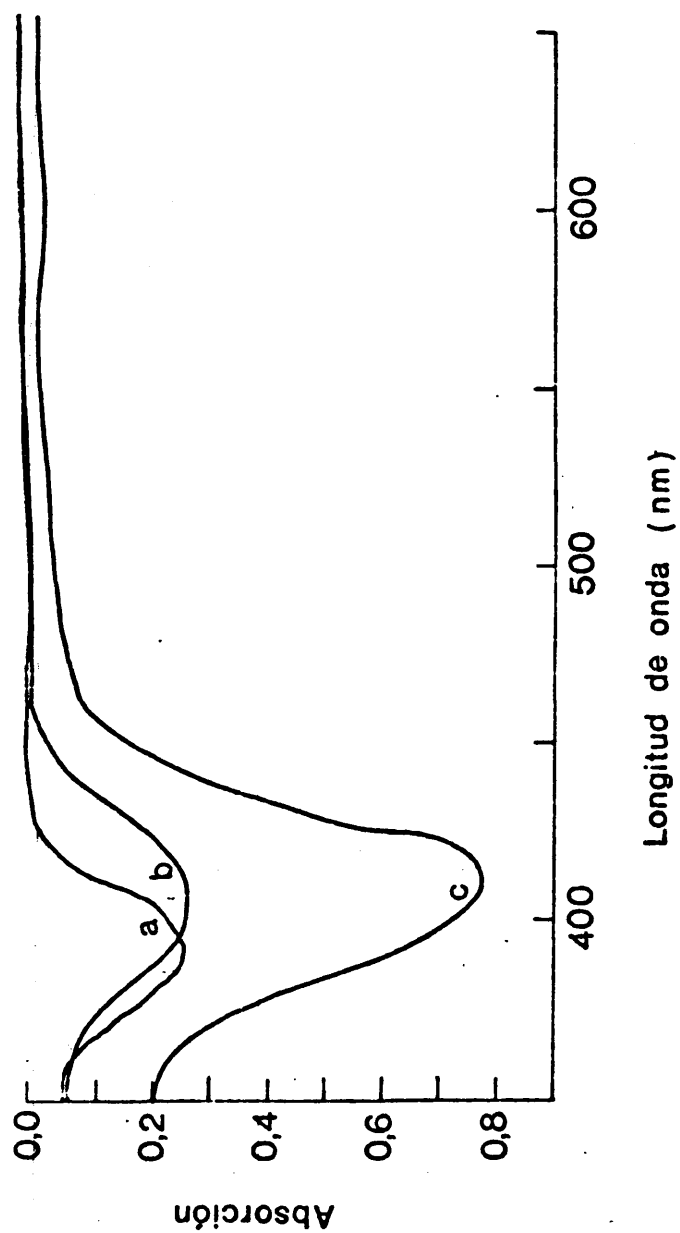


FIGURA 25

Espectros de absorción de ribosa (a) glucosa (b) y manosa (c); identificación por la reacción de sulfúrico y cisteína para pentosas.

La Figura 27, indica los espectros de absorción de las fracciones analizadas por el método de Dische para hexosas, cuyos resultados se presentan en la Tabla 14, utilizando como referencia un testigo de glucosa.

Los trabajos realizados en esta sección confirman la presencia de ácido ribonucleico en concentraciones no esperadas en esta membrana. La determinación de ribosa en una fracción liofilizada de la misma dio (ver más adelante) un contenido de 11,8% de RNA cuando sólo se esperaba encontrar vestigios.

Shapot y Davidova (296), informaron de la presencia de RNA en membranas, fracciones solubles y extractos orgánicos ácidos, no resulta entonces sorprendente que puedan permanecer en la fase no orgánica cuando la extracción de lípidos se realiza en presencia de SDS en el tampón, como se realiza en este trabajo.

#### FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES CON MEMBRANAS DE AMICON

Aplicación a la Fracción  $S_2 + I$  de la membrana R1.

La posibilidad de fraccionar componentes de una solución con el uso de membranas de Amicon, resulta atractiva por la sencillez y rapidez de su procedimiento.

La técnica se aplica a una solución de membrana procedente de la fracción  $S_2 + I$  de la membrana R1, pues en ella se identifican 9 a 11 bandas por análisis electroforético con una distribución de pesos moleculares de 17.800 a 74.200.

Se emplean en este experimento las membranas de Amicon UM10 que retienen partículas de peso molecular mayor que  $10^4$ , y UM2 que retiene partículas de peso molecular mayor que  $10^3$ .

Los resultados expresados en la Tabla 15, muestran que de los 13 mg de proteínas inicialmente utilizados, se recuperan 14,6 mg, que se distribuyen en la siguiente forma: el 88,8% del recuperado tiene un peso molecular mayor que  $10^4$ , el 2,9% es mayor que  $10^3$ , y el 8,2% es menor que  $10^3$ .

La recuperación de ribosa indica que se recupera el 94,5% y de este valor, el 88,9% tiene un peso molecular mayor que  $10^4$ , y 5,8% es de peso molecular menor que  $10^3$ .



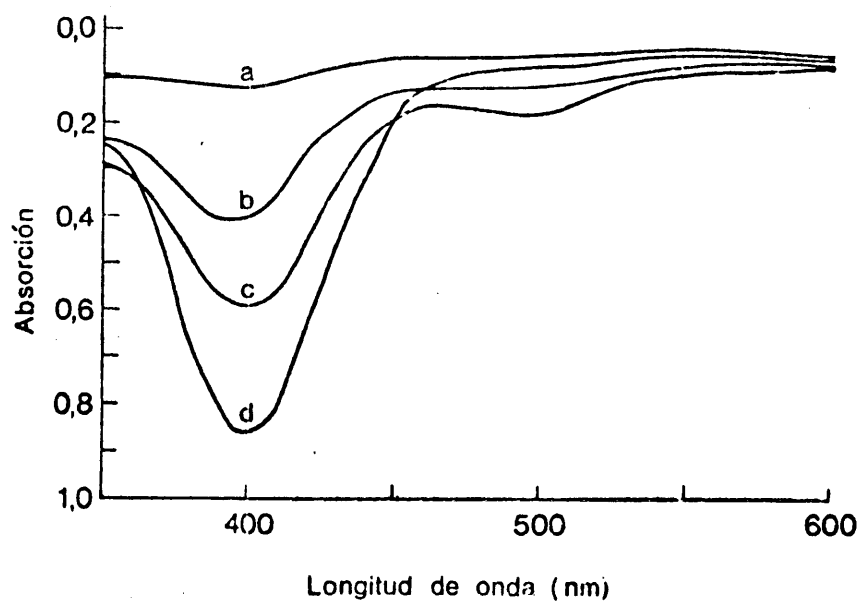


FIGURA 26

Identificación de pentosa en  $S_1$  y  $(S_2 + I)$  de membrana R1. Efecto del pH.  $S_1$  (a) y  $(S_2 + I)$  (c) aisladas a pH 5,2 y de las mismas fracciones  $S_1$  (b) y  $(S_2 + I)$  (d) aisladas a pH 7,5.

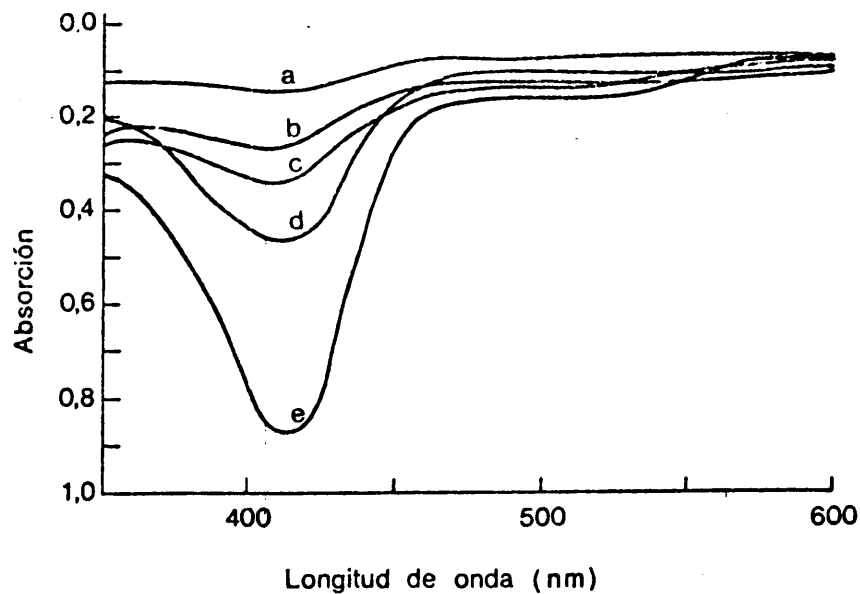


FIGURA 27 .

Identificación espectrofotométrica de hexosas en fracciones  $S_1$  y  $(S_2 + I)$  de membrana R1. Efecto del pH líneas b (fracción  $S_1$ ) y c (fracción  $S_2 + I$ ) aisladas a pH 5,2 líneas d (fracción  $S_1$ ) y e (fracción  $S_2 + I$ ) aisladas a pH 7,5, líneas a base del control sin hexosas.

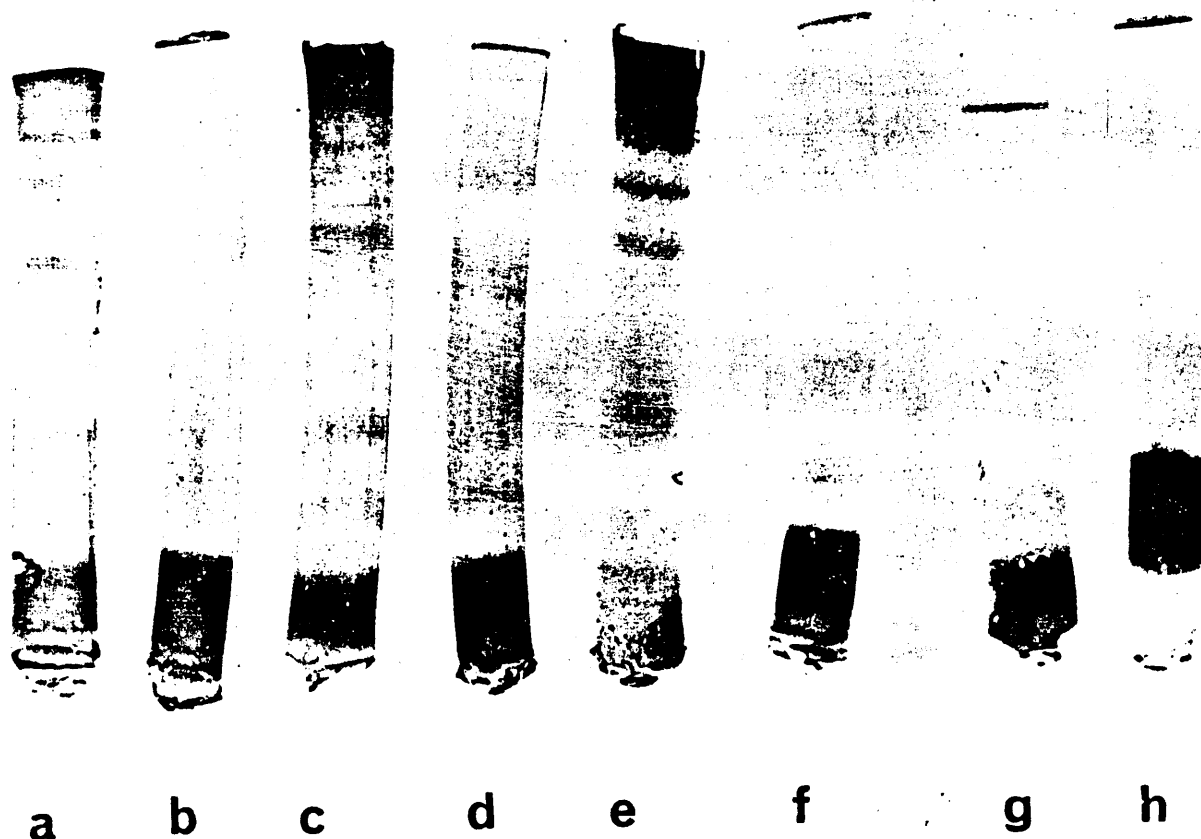


FIGURA 28

Identificación electroforética de RNA en membranas tipo, R 10, R1 y RS 10. Las soluciones se tratan como se indica en el texto y sus concentraciones se dan en pesos secos. La electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida al 10% y con tampón de SDS al 0,1%. Gel *a* electroforesis de 0,300 mg de membrana tipo; *c* 0,460 mg de membrana R 10; *e* 0,240 mg de membrana R 1; *g* 0,310 mg de membrana RS 10. Todos sin el tratamiento con RNasa. Gel *b* 0,320 mg de membrana tipo; *d* 0,280 mg de membrana R 10; *f* 0,200 mg de membrana R 1 y *h* 0,280 mg de membrana RS 10. Estos geles contienen las muestras luego del tratamiento con RNasa como se indica en el texto.

TABLA 15

Material	Proteínas		Ribosa		Hexosas	
	mg	%	mg	%	mg	%
Solución S <sub>2</sub> + I	13,00	---	0,182	---	0,930	---
Retenido UM 10	13,00	88,8	0,162	88,9	0,345	38,6
Retenido UM 2	0,43	2,9	0,010	5,8	0,367	41,1
Eluido UM 2	1,2	8,2	0	---	0,180	20,1

Fraccionamiento de solución (S<sub>2</sub> + I) con Amicón. Distribución de proteínas, ribosa y hexosas. La solución S<sub>2</sub> + I se obtiene al extraer lípidos con *n*-butanol de la membrana R1. (Ver Métodos y Materiales). Los porcentajes se calculan del total recuperado.

109

Hexosas se recuperan en un 95,9% y el 38,6% es retenido por la membrana UM10, el 41,1% por la membrana UM2 y el 20,1% es bajo peso molecular.

Estos resultados indican que el 89% de las proteínas se encuentran con sólo el 39% de hidratos de carbono, y si éstos interfieren en la de terminación del peso molecular, la interferencia dependerá de que sean pocas las proteínas asociadas con una gran cantidad de los azúcares. Si los mismos se repartieran por igual en todas las proteínas, su efecto en la movilidad sería mínimo, pues no interferiría mayormente con la in teracción entre las proteínas que las contienen y el SDS. Por lo tanto, para la mayoría de las bandas observadas, los pesos moleculares atribuidi dos son probablemente correctos.

El 2,9% de las proteínas de peso molecular mayor que  $10^3$  se combinan, en cambio, con el 41% de los azúcares y éstas, por consiguiente, tendrán una distribución en el gel que será función de su peso molecular y de la carga. Aún cuando la gran concentración de hidratos de carbono in terfiera en la interacción de las proteínas con el detergente, por su peso molecular será sin duda una banda rápida y, por lo tanto, presente en la región inferior del gel.

En la misma forma, el 8,2% de proteínas se asocia con el 20% de azúcares, en fracciones de peso molecular menor que  $10^3$ , y éstas, por consiguiente, serán también bandas muy rápidas.

Cuando esta solución se fracciona con Sephadex G-200, se observa que solamente las bandas rápidas contienen hidratos de carbono, resultando que está de acuerdo con las consideraciones anteriores.

La retención de material conteniendo ribosa por la membrana UM10, in dica que 89% de los mismos deben ser ácidos ribonucleicos, y un 6% de nucleótidos u oligonucleótidos de PM  $10^3$ . Si en su mayoría fuese t-RNA, también explica su presencia en las últimas fracciones de elución de la resina de Sephadex G-200.

## EXTRACCION COMPARATIVA DE ACIDOS RIBONUCLEICOS EN DIFERENTES TIPOS DE MEMBRANAS. DETERMINACION CUANTITATIVA. ANALISIS ELECTROFOTOMETRICO. IDENTIFICACION ELECTROFORETICA.

La presencia de ácidos ribonucleicos en membranas endoplasmáticas celulares ha sido mencionada previamente (296). La existencia en membranas bacterianas de diferentes tipos de ácidos nucleicos mencionada por varios autores (297, 298, 299) indica la participación de la membrana en la síntesis de proteínas y RNA. En *Listeria monocitogenes* (123) se indica la presencia de RNA en dos fracciones, una particulada y otra formada por protoplastos lavados y en ausencia de una estructura diferenciada. Los datos presentados para membranas de *M. lysodeikticus* por Salton (93) obtenidas en ausencia de cationes divalentes indican un contenido muy bajo de RNA e hidratos de carbono. En la membrana residual semejante a la R1 de este trabajo, obtenida previamente por Muñoz y Col. (152, 153), la presencia de EDTA en las soluciones de lavado sugería la liberación de RNA y/o hidratos de carbono en los eluyentes obtenidos. Los resultados de las investigaciones descritos en los capítulos precedentes de este trabajo sugirieron la necesidad de revisar los resultados obtenidos para la membrana tipo (104) y determinar su presencia en la membrana residual (152, 153). El análisis se extendió a otras membranas obtenidas como se indica en la sección correspondiente de este trabajo.

La determinación de RNA se realiza en fracciones obtenidas al extraerlas con los métodos de Ogur y Rosen o Método 1, o Ghosh y Murray o método 2. Estos métodos se aplicaron como se detalla anteriormente a preparaciones liofilizadas de membranas y a los residuos y fracciones obtenidas al extraer los lípidos de las membranas con cloroformo-metanol. La determinación de ribosa se hace por la reacción con orcinol (ver Métodos).

Los resultados de la Tabla 16 indica una concentración de ribosa de 2,6 a 3,5% para tres preparaciones diferentes de membrana tipo cuando los dos métodos se aplican directamente a la membrana liofilizada. Cinco preparaciones diferentes de membrana RS10 dan valores inferiores al 1%. Del análisis de membranas R10 resultan valores semejantes a los encontrados para la membrana tipo que son ligeramente inferiores en la membrana R1.

TABLA 16

Mem- bra- nas.	Peso seco	Extracción RNA				Residuo	Extrac.RNA			Residuo	Extrac.RNA		
		Método 1 Ribosa		Método 2 Ribosa		Libre de Lípidos	Método 1 Ribosa			Libre de Lípidos	Método 2 Ribosa		
		mg	%	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%		
Tipo	9,40	0,310	3,30										
Tipo	10,00	0,300	3,00										
Tipo	10,00	0,260	2,60										
Tipo	23,70			0,860	3,60	18,6	0,576	2,5					
Tipo	55,00			1,860	3,40								
Tipo	10,00			0,230	2,30								
Tipo	72,10					50,4	1,560	2,1					
Tipo	33,20					27,9	0,669	2,0					
Tipo	51,70									33,5	1,37	2,6	
Tipo	51,70									43,8	1,80	3,5	
RS 10	12,60	0,007	0,07										
RS 10	17,00	0,044	0,26										
RS 10	12,90	0,074	0,57										
RS 10	35,90			0,099	0,27								
RS 10	9,26			0,050	0,54								
R 10	7,90	0,230	2,9										
R 10	31,30	1,030	3,3										
R 10	67,80			1,600	2,3								
R 10	67,80			1,800	2,6								
R 1	17,4	0,330	1,9										
R 1	28,4	0,670	2,4										
R 1	63,0			0,992	1,6								

Extracción comparativa de RNA en membrana tipo, RS 10, R 10 y R 1. La definición de estas membranas está dada en la sección de Métodos y Materiales. La determinación de ribosa se realiza en las fracciones obtenidas por aplicación de los Métodos 1 y 2 para extraer RNA. También se aplican estos métodos para la determinación de ribosa en los residuos de la membrana tipo extraída con cloroformo-metanol. Los porcentajes se refieren a peso seco.

La aplicación de los Matodos 1 y 2 al residuo de la extracción con cloroformo-metanol de la membrana tipo nos da valores ligeramente menores que los obtenidos en las membranas liofilizadas. Este hecho es más marcado cuando la determinación se realiza en fracciones obtenidas con el Método 1.

La concentración de ácido ribonucleico se estima en función del contenido de ribosa en patrones de RNA de levadura y de patrones de ribosa que en las condiciones experimentales dan para la reacción con orcinol la relación siguiente:

$$\frac{(\text{mg/D.O.}) \text{ RNA}}{(\text{mg/D.O.}) \text{ Ri}} = 5,2$$

resultando promedio de 10 determinaciones independientes.

Los resultados de la Tabla 17 indican el contenido de RNA promedio de las determinaciones de ribosa detalladas en la Tabla 16. Los valores obtenidos para la membrana tipo resultan mayores que los indicados por otros autores (93, 173) y pueden deberse a diferentes condiciones experimentales. En este trabajo, las determinaciones se realizan en fracciones específicas de aislamiento de RNA y en condiciones en que los lípidos se extraen previamente o quedan en la membrana. La extracción directa con ácido perclórico (Método 1) probablemente insolubiliza los lípidos con el residuo. En la extracción con el Método 2 los lípidos se extraen antes que los ácidos nucleicos. En el material libre de lípidos el análisis se hace en el residuo obtenido al extraer los lípidos con cloroformo-metanol en condiciones similares a las resultantes de aplicar ambos métodos, a la membrana liofilizada. En un intento de determinar si la presencia de lípidos interfiere en la reacción de orcinol con ribosa, se agregaron alicuotas de un extracto lipídico de *n*-butanol de membrana R1 a concentraciones conocidas de la solución testigo de RNA de levadura. La reacción de orcinol en estas condiciones da valores cinco veces menores que los de la solución testigo conteniendo idéntico volumen de *n*-butanol.

En algunos experimentos no incluidos en este trabajo los valores obtenidos de ribosa con el Método 2 aplicado a residuos libres de lípidos por acción del cloroformo-metanol resultaban más bajos que los obtenidos cuando el mismo método se aplica a la membrana liofilizada. La diferencia está en que en el Método 2, los lípidos residuales se extraen

TABLA 17

Membranas	Extracción Directa		Material libre de Lípidos	
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
	RNA%		RNA%	
Tipo	15,4 (3)	16,1 (3)	11,8 (3)	15,8 (2)
RS 10	1,6 (3)	2,1 (2)	-----	-----
R 10	16,1 (2)	12,5 (1)	-----	-----
R 1	11,1 (2)	8,2 (1)	-----	-----

Extracción comparativa de RNA. Los resultados de la Tabla 15, expresados en mg de ribosa se transforman en mg de RNA al multiplicar por 5,2. Los valores representan el promedio del número de preparaciones indicadas entre paréntesis. La extracción directa en membranas con los métodos 1 y 2 y la extracción en el residuo de lípidos (extraídos con cloroformo-metanol) se describen en la sección correspondiente. Los porcentajes se refieren a peso seco.



nuevamente con alcohol ácido, metanol y acetona metanol. Se pensó que la extracción con cloroformo-metanol permitía pasar a la fase orgánica ácidos nucleicos liposolubles. El análisis espectrofotométrico del residuo orgánico con cloroformo-metanol permitía pasar a la fase orgánica ácidos nucleicos liposolubles. El análisis espectrofotométrico del residuo orgánico con cloroformo-metanol vuelto a extraer con perclórico 0,5 M indica la presencia de material que absorbe en el ultravioleta con un máximo a 260 nm y una curva de apariencia similar al espectro de guanina. La determinación analítica, sin embargo, indicaba la presencia de trazas de ribosa. En el análisis espectroscópico no se descarta la posible interferencia de los carotenos y menaquinonas que también absorben en el ultravioleta. La posible presencia de estos componentes en el extracto perclórico no fue analizada. La mayor sensibilidad del análisis espectroscópico de ácidos nucleicos se basa en el alto valor de su coeficiente molar de absorción y permite la determinación de menores cantidades de los mismos en ausencia de contaminantes de propiedades espectroscópicas similares. Esta dirección de trabajo no se continuó por salirse del objetivo primario del mismo Cabe destacar, sin embargo, que el RNA encontrado en algunas membranas tiene un alto contenido de guanina.

La posible existencia de una ribonucleoproteína extraíble con solventes orgánicos significaría que los valores presentados en este trabajo tampoco son los verdaderos. Otra consideración a tener en cuenta es que la determinación de orcinol es función de la composición del ácido nucleico estudiado, y en el análisis utilizamos como testigo RNA de levadura. La purificación del ácido nucleico de membrana y su análisis servirían de base para una revisión de estos resultados.

La comprobación de la presencia de ácidos ribonucleicos en las membranas incluidas en este estudio se realiza por análisis electroforético. Para ello, soluciones de membranas fueron tratadas con RNasa como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Alícuotas de las mismas y de soluciones testigos (no tratadas con RNasa) se analizan por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Los resultados de la Figura 28 indican que por efecto de la RNasa desaparecen en los geles de las membranas tratadas las bandas de alto peso molecular aún presentes en la membrana RS 10 (gel f) que contiene aproximadamente el 2% de

RNA. La banda observada observada en la sección inferior del gel aumenta en todos los geles. La presencia de banda inferior indica que a pesar de la acción enzimática, aún quedan restos de oligonucleótidos y/o nucleótidos, observables. Si estas fracciones fueran no dializables, podrían existir contaminantes nucleicos incluso en membranas tratadas con RNasa.

Por último, la diversidad de las bandas presentes en las membranas no tratadas, indica la presencia de ácidos ribonucleicos de diferentes propiedades (ribosomal, mensajero o de transferencia u otros), pero cuya identificación no fue intentada.

También se identificó ribosa en extractos obtenidos aplicando el Método 2 a las membranas o sus residuos libres de lípidos. El análisis espectrofotométrico indica la presencia de ribosa en los extractos de TCA, AP y A. En la membrana tipo, se obtuvo una reacción con orcinol en la fracción separada con 0,5 M y PCA en caliente, indicando que la extracción con 1 M en frío no era siempre suficiente para determinar todo el material presente. La ausencia de DNA en todas las membranas analizadas nos permite asimilar ambos valores como ácido ribonucleico. Detalles del método empleado parecen sugerir que las condiciones para hidrolizar ácidos ribonucleicos de membranas exigen condiciones más drásticas que las corrientemente empleadas.

La Figura 29 presenta los espectros obtenidos con la reacción de orcinol para los azúcares presentes en la membrana tipo y en algunas fracciones obtenidas aplicando el Método 2 a esta membrana. Se incluye el espectro de una solución testigo conteniendo manosa y ribosa en la proporción de 5/1 (línea 1). La solución inicial de membrana (línea 2) contiene ribosa, que también se identifica en los extractos de ácido tricloroacético (TCA), alcohol-perclórico (AP) y alcohólico (A) de las líneas 3, 4 y 5 respectivamente. Cabe destacar que la presencia de manosa en el testigo no induce una absorción máxima a 580 nm (característica de otras hexosas) sino una inflexión en las proximidades de 540 nm.

La Figura 30 indica los espectros obtenidos con la misma forma de análisis para la membrana R 10. Se detecta ribosa en todas las fracciones excepto en el extracto alcohólico (línea 3). El espectro del extracto conteniendo RNA (extraído con 1 M PCA), es el correspondiente a la reacción de ribosa (línea 4). También se detecta ribosa en la solución

de membrana no fraccionada con el Metodo 2 (línea 5).

La Figura 31 presenta los espectros obtenidos en fracciones de membrana RS 10 extraída de acuerdo al Método 2. No se detecta ribosa en los extractos TCA y A (líneas 1 y 3). El espectro del extracto conteniendo RNA (línea 4) indica la presencia de ribosa.

#### EXTRACCION COMPARATIVA DE HEXOSAS EN DIFERENTES TIPOS DE MEMBRANAS. DETERMINACION CUANTITATIVA Y ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO.

El contenido de hidratos de carbono en membranas tipo de *M. lysodeikticus* ha sido previamente investigado por Gilby y Col. (173) y por Nachbar y Salton (287) con resultados contradictorios. Los experimentos mencionados en los capítulos anteriores de este trabajo indicaban también la presencia de hexosas en la membrana residual en la cual no se habían estudiado previamente.

El contenido de hexosas en las diferentes membranas obtenidas como se indica en la sección de Métodos y Materiales, se analiza también con los Métodos 1 y 2 utilizados para las determinaciones del contenido de ácidos ribonucleicos. También se determinan en el residuo de las membranas extraídas con cloroformo-metanol.

Los resultados de la Tabla 18, indican el contenido de hexosas en residuos de membranas libres de lípidos por el método de Folch (ver Método y Materiales - extracción de lípidos). El análisis de hexosas se realiza por el método de Dische para hexosas, también descrito anteriormente, usando manosa como testigo. La determinación incluye el análisis en los lavados acuosos del extracto lipídico y en el residuo obtenido al reextraer estas fracciones. La membrana tipo (tres preparaciones diferentes) contiene 11,9%, la membrana RS 10 12% (dos preparaciones diferentes), la membrana R1 5,1% y la membrana R 10 6,3% (dos preparaciones diferentes). Estos resultados promedios indican aproximadamente la misma concentración de hexosas para las membranas tipo RS 10, y la mitad de éstas para las membranas R10 y R1.

Los resultados de la Tabla 19 indican el porcentaje de azúcares recuperados cuando se incluye el contenido del lavado de lípidos mencionados anteriormente. Como puede observarse, si este contenido no se incluye

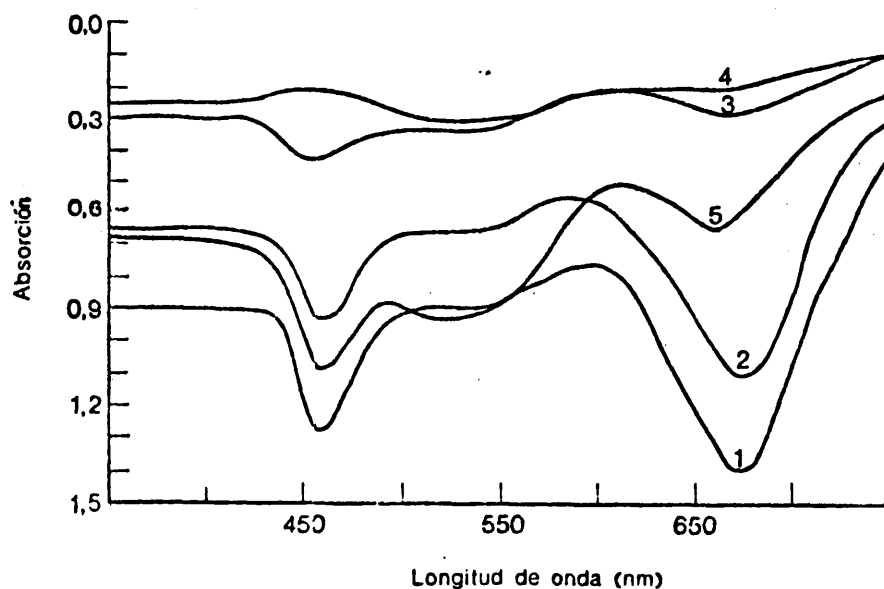


FIGURA 29

Identificación espectrofotométrica de ribosa con el método de orcinol. Espectros de membrana tipo y algunas fracciones obtenidas con el Método 2. Línea 1. Testigo de manosa (200  $\mu$ g) y ribosa (20  $\mu$ g). Línea 2. Solución inicial de membrana tipo. Línea 3. Fracción del extracto de TCA. Línea 4. Fracción de extracto AP. Línea 5. Fracción del extracto A. Las características de los diferentes extractos se dan en Métodos y Materiales.

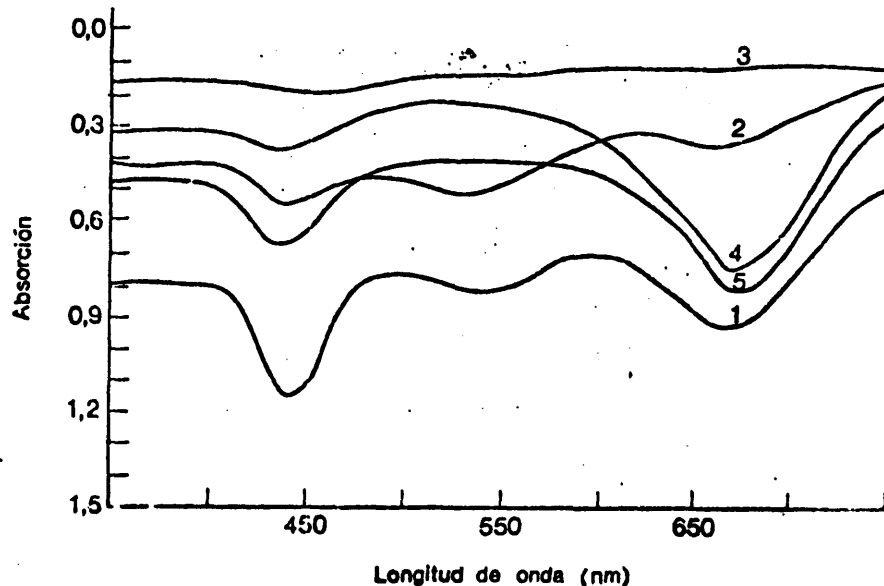


FIGURA 30

Identificación espectrofotométrica de ribosa con el método de orcinol. Espectros de membrana R10 y algunos extractos obtenidos con el Método 2. Línea 1. Fracción del extracto TCA. Línea 2. Fracción extraída con AP. Línea 3. Fracción extraída con A. Línea 4. Fracción extraída con 1 M de PCA. Línea 5. Solución inicial de membrana. Ver Métodos y Materiales para detalles experimentales.

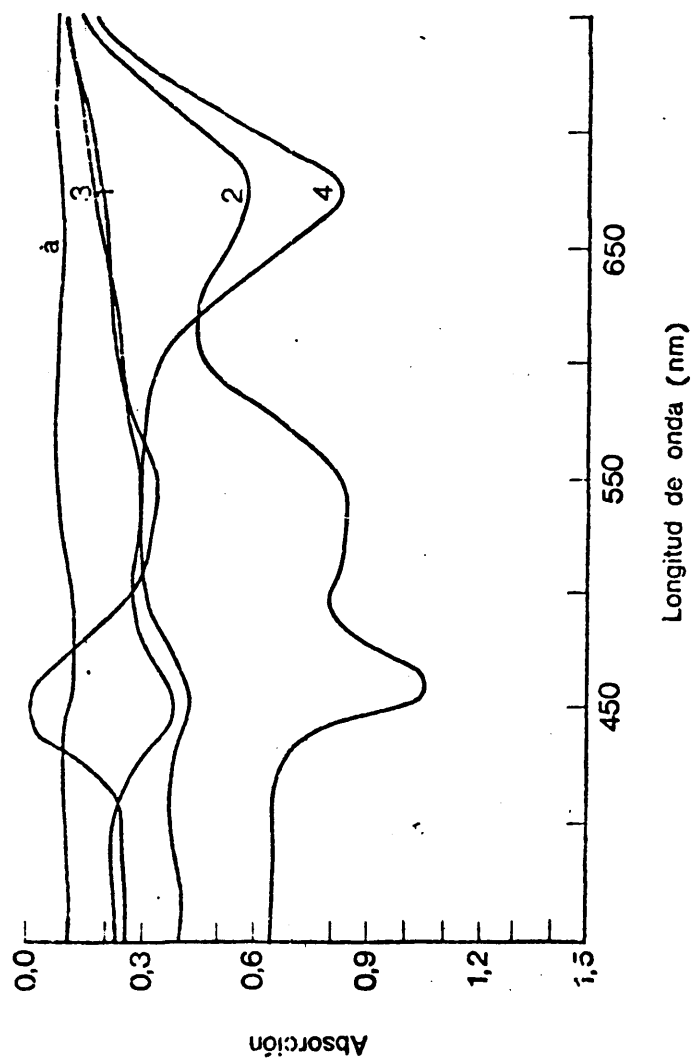


FIGURA 31

Identificación espectrofotométrica de ribosa con el método del orcinol. Espectros de las membranas RS 10 y algunos extractos obtenidos con el Método 2. Línea 1. Fracción del extracto TCA. Línea 2. Fracción extraída con AP. Línea 3. Fracción extraída con 1 M PCA. a línea base. Ver Métodos y Materiales para detalles experimentales.

TABLA 18

Membranas	Peso seco	Residuo Libre de Lípidos Peso seco	Residuo Libre de Lípidos	Lavado Acuoso	HEXOSAS	
					mg	mg
Tipo	33,2	26,10	2,50	0,870	10,1	
Tipo	51,7	33,50	6,60	1,370	15,4	
Tipo	51,7	43,80	5,00	0,336	10,3	
AS 10	18,8	11,10	1,65	0,231	10,0	
R 10	42,1	36,80	2,61	0,630	7,6	
R 10	96,4	73,60	3,97	0,900	5,1	
R 1	31,0	19,10	0,97	0,370	4,3	
R 1	20,3	8,85	0,71	0,170	4,3	
R 1	22,7	12,8	1,31	0,255	6,9	

Determinación de hexosas en diferentes membranas. Al contenido en el residuo libre de lípidos se le añade el determinado en el lavado acuoso de los lípidos. Cada determinación corresponde a diferentes preparaciones en las membranas.

TABLA 19

Membranas	Total	Lavado Acuoso de Lípidos	
		HEXOSAS	
	mg	mg	%
Tipo	3,40	0,87	25,5
Tipo	7,97	1,37	17,1
Tipo	5,34	0,34	6,4
RS 10	8,21	0,21	2,5
RS 10	2,11	0,23	10,9
R 10	3,24	0,63	19,4
R 10	4,87	0,90	18,4
R 1	1,34	0,37	27,6
R 1	0,88	0,17	19,3
R 1	1,57	0,26	16,5

Recuperación porcentual de hexosas solubles en agua de los extractos cloroformo metanol.



yera en el análisis, se perdería aproximadamente un 16,3% de hexosas para la membrana tipo, un 20% para las membranas R1 y R10 y un 6,7% para la membrana RS10.

También se analiza el contenido de hexosas en las membranas liofilizadas y los residuos de su extracción con cloroformo-metanol, cuando se fraccionan como se indica con el Método 2. Los resultados de la Tabla 20 indican el contenido de hexosas en las fracciones así obtenidas como también en el lavado acuoso de los extractos orgánicos de cloroformo-metanol mencionado para las Tablas 18 y 19. Estos valores, aunque repetidos, se incluyen para un mejor análisis del resultado cuando el Método 2 se aplica al residuo. También se incluye, además, el contenido de hexosas obtenido al lavar con agua los residuos finales obtenidos por la aplicación del Método 2. La distribución de hexosas en las diferentes fracciones analizadas sugiere la presencia de hexosas en diferentes materiales, y confirman los resultados mencionados en la Tabla 18 cuando se suman los contenidos de todas las fracciones, cuando esto es posible, ya que en algunos casos el análisis es incompleto. Se obtiene así el 12,6% para la membrana tipo, 11,6% para la membrana RS10, y el 6,8% para la membrana R1 y 5,9% para la membrana R10.

La Tabla 21 analiza los porcentajes de hexosas obtenidos en los extractos TCA, AP y A (tricloroacético, alcohol perclórico y alcohólico) e indica que estos solventes extraen aproximadamente el 40% del total de azúcares presentes en la R1, el 21,5% de los totales en la membrana RS10, y el 86% de los contenidos en la membrana R10. Los residuos finales de la extracción contienen aún azúcares al 17,7 y 23,1% para las RS10 y R1 y sólo el 8% para la membrana R10. También se extraen azúcares al lavar con agua estos residuos, antes de liofilizarlos, para su estudio posterior. Si estos lavados no se incluyeran en el análisis se perdería el 6,9%, 11,1% y el 5,2% de azúcares en las membranas RS10, R1 y R10.

Cabe destacar que en la Tabla 20, no se incluyen los lavados de los lípidos extraídos en los solventes metanol y acetona-metanol empleados en el Método 2; tal vez, el empleo de estos solventes disminuye la contaminación de hexosas en los lípidos.

Del análisis de estos resultados, podría deducirse que aún cuando la membrana RS10 contiene el mismo porcentaje de azúcares que la membrana



TABLA 21

Membrana	H E X O S A S						
	Total	Fracciones TCA, AP, A		Residuo Final		Lavado acuoso Residuo Final	
	mg	mg	% total	mg	% total	mg	% total
RS 10	4,25	0,914	21,5	1,180	27,7	0,295	6,94
R 1	4,32	1,690	39,1	0,996	23,1	0,480	11,10
R 10	4,20	3,600	85,7	0,346	8,3	0,220	5,20

Distribución porcentual de hexosas en fracciones obtenidas al aplicar el Método 2 en membranas RS 10, R 1 y R 10.

tipo, sus propiedades son diferentes. Las membranas R1 y R10 que contienen en cambio menor concentración de hidratos de carbono que la membrana tipo, presentan semejantes propiedades de distribución y solubilización. Estos resultados pueden presentar una diferencia en la organización de los hidratos de carbono en las membranas estudiadas. Este problema podría ser investigado empleando técnicas específicas para identificar, por ejemplo, su presencia, como polisacáridos, glicolípidos o glicoproteínas.

El contenido de hidratos de carbono de estas membranas indica que para la membrana tipo, se obtienen valores intermedios a los obtenidos por Gilby y Col. y por Nachbar y Salton (127, 152). Las diferencias pueden deberse a pérdidas cuando la determinación se efectúa en el residuo extraído por cloroformo-metanol, aún cuando algo se recupere al lavarlos. El mayor resultado obtenido por Gilby y Col., puede deberse a una extracción más específica de los lípidos en metanol y éter empleado por esos autores.

La identificación espectrofotométrica de hexosas de los datos analíticos presentados en esta sección se hace también en algunas de las fracciones resultantes del Método 2, y en los residuos de la extracción de lípidos de las membranas con cloroformo-metanol.

La Figura 32 muestra los espectros obtenidos para los azúcares de la membrana tipo en las fracciones de TCA, AP y A (tricloroacético, alcohol perclórico y alcohólico) y determinados con el método de Dische para hexosas. Los resultados permiten la identificación espectrofotométrica de hexosas pero no su especificación.

La Figura 33 estudia los espectros obtenidos en las fracciones de las membranas R10 y RS10. Las líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a la membrana R10. Las líneas 1 y 4 son los espectros de los extractos alcohólicos para dos concentraciones diferentes, la línea 2 corresponde a la fracción TCA y la línea 3 a la fracción AP. En el caso de la membrana RS10 el espectro 5 corresponde a la fracción TCA y los espectros 6 y 7 a dos concentraciones diferentes del extracto AP. El espectro de esta última fracción indica la presencia de hexosas (inflexión a 416 nm) además de un compuesto no identificado con un máximo de absorción de 470 nm.

La Figura 34 muestra los espectros obtenidos en residuos de membra-

nas R1, RS10 y tipo, luego de extraer los lípidos con cloroformo-metanol (líneas 1, 2 y 3 respectivamente). En un intento de diferenciar específicamente los diferentes azúcares que pudieran estar presentes, sus espectros se repiten a las 48 horas (líneas 5, 6 y 7 en el mismo orden). Como estas fracciones contienen además ribosa, se incluye el espectro de la misma obtenido a las 48 horas de su análisis inicial (línea 4). Los espectros iniciales de membranas R1 y RS10 presentan un máximo a 600 nm, así como la disminución del máximo a 416 nm. La ausencia de este máximo para la ribosa, sugiere la presencia de otros azúcares no identificados hasta ahora.

El análisis espectrofotométrico de los residuos obtenidos luego de extraer las membranas R1, RS10, R10 y tipo con el Método 2, aparece en la Figura 35. Las líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a los sedimentos en el orden mencionado. Los espectros correspondientes a estas líneas se repiten a las 48 horas, obteniéndose las líneas 7, 8, 9 y 10 también en el mismo orden. Las líneas 5 y 6 corresponden a testigos de manosa y ribosa obtenidos a las 48 horas de la reacción inicial. Puede observarse que el pico para el testigo de ribosa (hacia 540 nm) no coincide con los máximos observados para los espectros 7, 8, 9 y 10, obtenidos al mismo tiempo. En cambio, en estos espectros se observa un máximo a 505. Los espectros iniciales (líneas 1, 2, 3 y 4) muestran el máximo de 505 nm que aumenta a las 48 horas para las membranas R1, R10 y tipo (compárense las líneas 1-3; 4-7 y 9-10) mientras que disminuye para la membrana RS10. El testigo de manosa no presenta inflexión en este rango (línea 6). En todos los residuos se observa el máximo característico de hexosas a 414 nm. El máximo de absorción a 505 nm sugiere la presencia de aldo o ceto heptosas.

Los residuos de las membranas tipo y RS10, fueron también investigados por la reacción de orcinol analizando los espectros respectivos. En la Figura 36 se presenta el análisis de los espectros de estos azúcares y de un testigo de ribosa. Puede observarse que los espectros correspondientes a los residuos de membrana tipo y RS10 (líneas 2 y 3) presentan un máximo entre 440 y 445 nm mucho mayor que el de la ribosa (línea 1). Estos residuos presentan, además, un máximo a 540 nm no presente en la solución del testigo. Este segundo máximo (540 nm) sugiere la presencia de ribulosa en estas muestras. La solución de ribosa, en cambio, presenta su máximo característico a 670 nm.

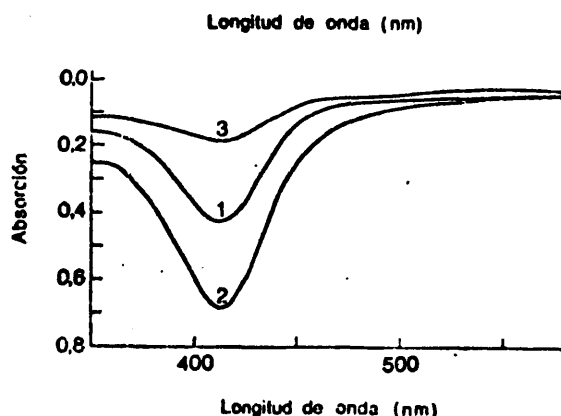


FIGURA 32

Identificación espectrofotométrica de hexosas en membrana tipo fraccionada de acuerdo al Método 2. Línea 1. Fracción del extracto TCA. Línea 2. Fracción de extracto AP. Línea 3. Fracción del extracto A.

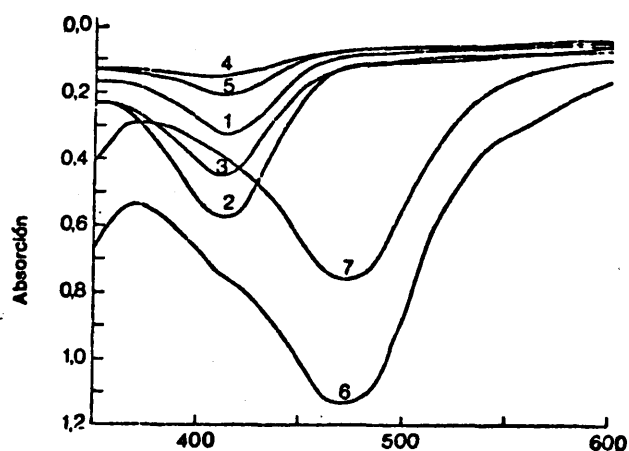


FIGURA 33

Identificación espectrofotométrica de componentes de membrana R10 y RS10 fraccionadas de acuerdo al Método 2. Las líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a la membrana R10. Las líneas 2 y 4 son los espectros de los extractos alcohólicos para dos concentraciones diferentes, la línea 2 corresponde a la fracción TCA y la línea 3 a la fracción de AP. Las líneas 5, 6 y 7 son los espectros de fracciones de la membrana RS10. La línea 5 corresponde al espectro de la fracción TCA y las líneas 6 y 7 a dos concentraciones diferentes al extracto AP.

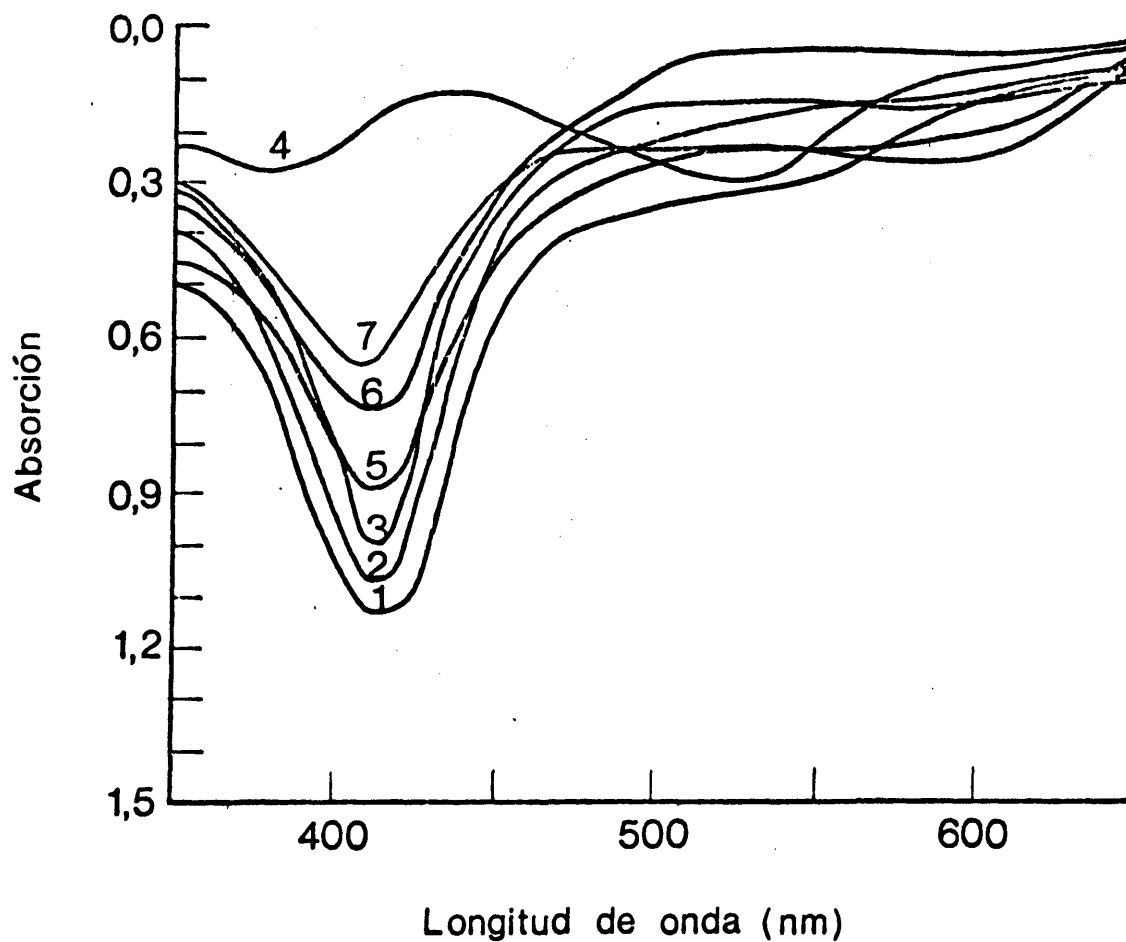


FIGURA 34

Identificación espectrofotométrica de hexosas en residuo de membranas R1, RS10 y tipo, extraídas con cloroformo-metanol. Línea 1. Membrana R1. Línea 2. Membrana RS10. Línea 3. Membrana tipo. Línea 4. Espectro de 200  $\mu$ g de ribosa a las 48 horas de efectuada la reacción. Líneas 5, 6 y 7 representan los espectros 1, 2 y 3 analizados a las 48 horas.

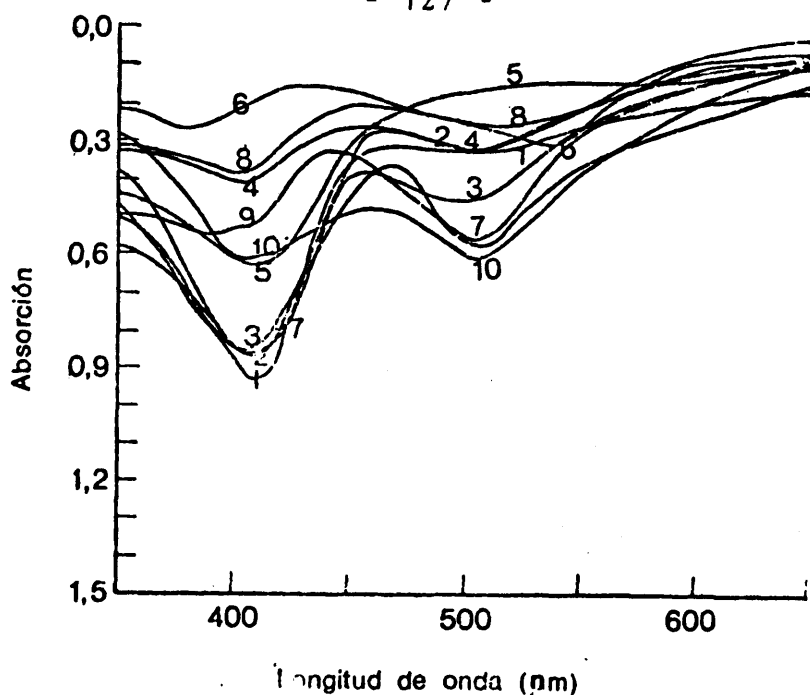


FIGURA 35

Identificación espectrofotométrica de hexosas en los residuos obtenidos luego de extraer membranas con el Método 2. Espectros 1, 2, 3 y 4 de sedimentos de membrana R1, RS10, R10 y membrana tipo respectivamente. Línea 5. 200  $\mu$ g de manosa a las 48 horas de la reacción de hexosas. Línea 6. Espectro de 200  $\mu$ g de ribosa a las 48 horas de la reacción. Líneas 7, 8, 9 y 10. Corresponden a los espectros 1, 2, 3 y 4 también a las 48 horas de la reacción.

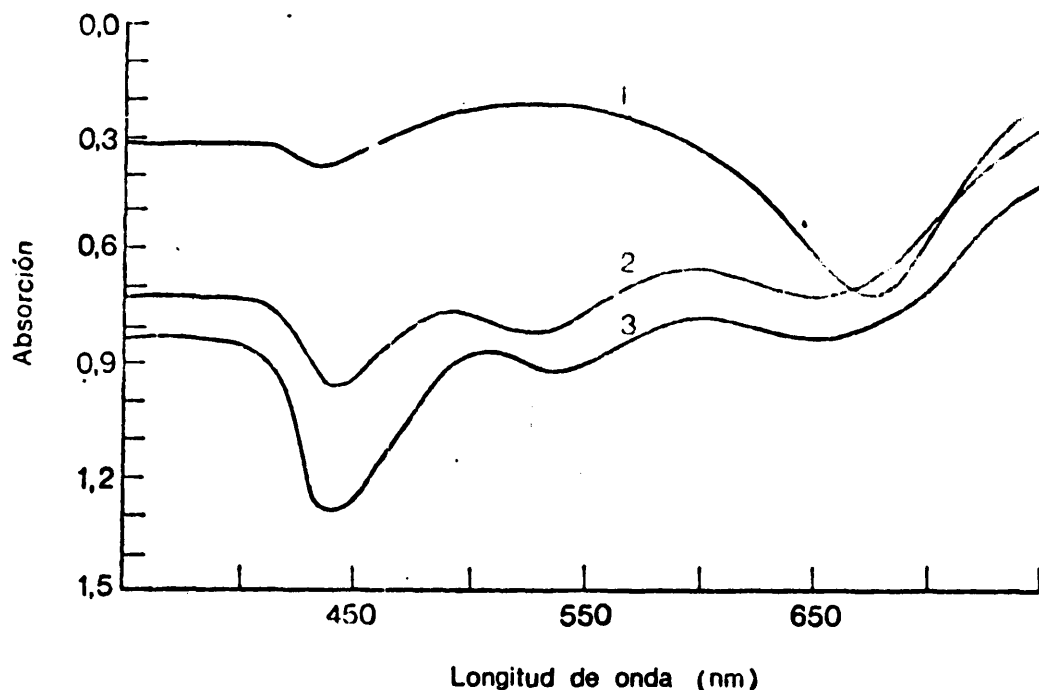


FIGURA 36

Identificación espectrofotométrica de pentosas por orcinol. Análisis del residuo final obtenido al extraer membrana tipo y RS10 con el Método 2. Línea 1. Es un control de ribosa (16  $\mu$ g). Línea 2. Residuo de membrana tipo. Línea 3. Residuo de membrana RS10.

La identificación espectrofotométrica indica la presencia de hexosas en la membrana tipo y demás membranas analizadas. Señala también la presencia de otros azúcares que por sus espectros secundarios pudieran ser aldo o ceto-heptosas, o ribulosa entre otros. La posibilidad de que otros componentes no azucarados diesen los espectros observados se descarta ya que los análisis realizados utilizan como referencia alícuotas de las muestras respectivas en las que se agrega agua en lugar de cisteína u orcinol.

#### IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA DE AZUCARES.

La identificación cromatográfica de azúcares específicos se realiza en los sedimentos obtenidos luego de extraer las diferentes membranas con cloroformo-metanol. La preparación de las muestras para el análisis se indica en la sección de Materiales y Métodos.

La Tabla 22 ilustra los azúcares identificados en las distintas clases de membranas en función de la concentración de ácido empleada, de los tiempos de hidrólisis y de los reactivos empleados para su detección. Se detecta así en los residuos de membrana tipo, la presencia de manosa, glucosa, ribosa, hexosaminas y, tal vez, ceto-heptosas. No se detecta galactosa bajo ninguna condición de hidrólisis; manosa, glucosa o ribosa desaparecen si se aumenta el tiempo de hidrólisis y/o la concentración del ácido clorhídrico.

En la membrana RS10 se detecta, en cambio, galactosa y no ribosa además de los otros azúcares mencionados. Los residuos de las membranas R10 y R1 contienen los mismos azúcares que la membrana tipo. En los residuos de las membranas R10 y R1 se detectan hexosaminas, aún en condiciones suaves de hidrólisis, y no se observan en la membrana RS10 (tal vez debido al tiempo incompleto de hidrólisis). La coloración verdosa o violeta con reactivo Bial, se observa en la membrana R1.

Los resultados de la Figura 37 muestran la identificación de azúcares reductores en los residuos de membranas tipo (SM) RS10 (MRS10) y R10 (MR10), comparando la movilidad con una solución testigo conteniendo glucosa, ribosa, manosa y galactosa. Las condiciones de hidrólisis para el residuo de membrana RS10 de esta fotografía es de 3 horas y para los otros residuos los indicados en la figura.

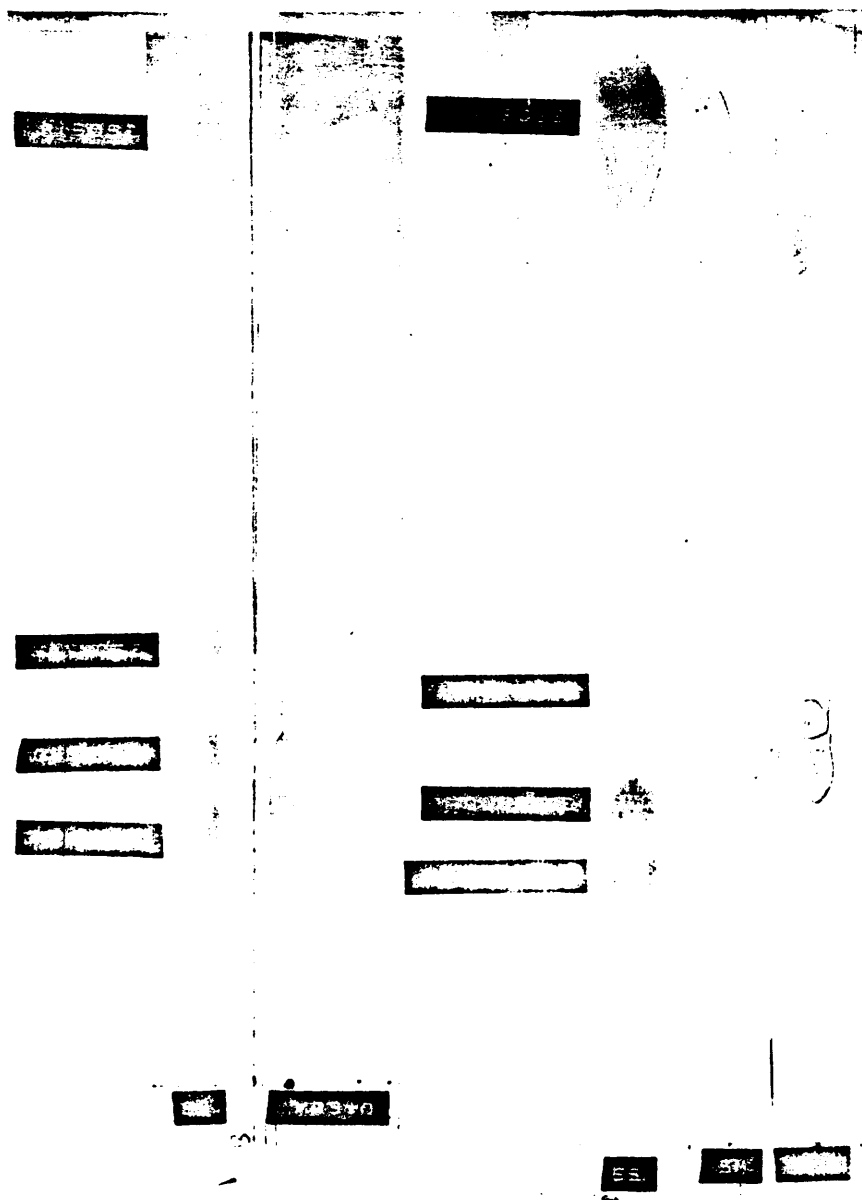


FIGURA 37

Identificación de azúcares reductores en membranas tipo, RS10 y R10. SS es un patrón de ribosa, manosa, glucosa y galactosa, MRS10 es la fracción residual de extraer lípidos de la membrana RS10 en la cual se realiza el análisis cromatográfico, tiempo de hidrólisis de 3 horas. SM es la fracción residual de extraer lípidos en la misma forma de la membrana tipo, tiempo de hidrólisis 1 hora. MR10, idéntico procedimiento, pero de la membrana R10, tiempo de hidrólisis 1,5 horas. En todos los casos se emplea ácido clorhídrico 1N.



TABLA 22

Material Membranas	HCl	Tiempo Hidrol. (horas)	Reacción de anilina				Reacción Bial	Reacción Elson-Morgan
			Ma.	Glc.	Gal.	Rib.		
Tipo	1	1,0	+	+	-	+	no hecho	no hecho
Tipo	2	2,0	-	-	-	-	verdoso(orig.)	naranja
Tipo	3	4,0	-	-	-	-	no hecho	origen
Tipo	2	4,0	-	-	-	-	----	naranja(origen)
Tipo	4	2,0	-	-	-	-	----	naranja(origen)
Tipo	4	5,0	-	-	-	-	----	naranja(origen)
Tipo	4	8,0	-	-	-	-	----	2 manchas(orig)
RS 10	1	2,0	+	+	+	-	----	-----
RS 10	1	3,0	?	+	+	-	----	-----
R 10	1	1,5	+	+	-	+	no hecho	no hecho
R 10	2	1,5	+	+	-	+	----	no hecho
R 10	1	1,5	+	+	-	+	verdoso(orig.)	naranja(origen)
R 1	1	2,0	+	-	-	+	no hecho	no hecho
R 1	1	1,5	+	+	-	+	no hecho	no hecho
R 1	2	2,0	+	-	-	-	violeta(orig.)	no hecho
R 1	1	1,5	+	+	-	+	verdoso(orig.)	naranja(origen)
R 1	2	2,0	+	-	-	-	verdoso(orig.)	naranja(origen)
R 1	2	4,0	-	-	-	-	----	naranja(origen)

Efecto de la concentración de ácido y del tiempo de hidrólisis en la identificación de azúcares por cromatografía en membranas de *M. lysodeikticus*.

La Figura 38 muestra galactosa, glucosa y manosa en el residuo de membrana RS10 luego de 2 horas de hidrólisis, y de manosa y ribosa en la membrana R1.

La Figura 39 muestra las hexosaminas en los residuos de membrana tipo hidrolizados durante 3 y 5 horas con ácido clorhídrico 4M. El resultado indica la presencia de una mancha positiva que en la figura *a* (8 horas de hidrólisis) es más lenta que la glucosamina de referencia, y a la misma distancia que el control en *b* (5 horas de hidrólisis). El testigo de glucosamina se somete a las mismas condiciones de hidrólisis que la muestra, y la aparición de más de una mancha coloreada se debe, probablemente, a la presencia de contaminantes del testigo o debido a la descomposición en diferentes productos como consecuencia de las condiciones de la hidrólisis.

La Figura 40 muestra las coloraciones observadas para los residuos analizados de membranas R1, tipo y R10 después de revelar por el reactivo de Bial. Las manchas verdosas observadas en el origen, no coinciden con la movilidad del testigo que, en este caso, es sedoheptulosa.

Se intentó confirmar la presencia de heptosas con el procedimiento de Wright y Rebers que se indica en la sección de Métodos. Se obtuvieron valores de 0,34% para la membrana tipo, 0,93%; 0,63% y 0,43% para las membranas R10, R1 y RS10 respectivamente, referidos a un testigo de sedoheptulosa. La Figura 41 presenta el análisis de los espectros correspondientes a los productos de la reacción. Aún cuando para todas las muestras se obtiene un máximo o una inflexión a 500 nm, característico de sedoheptosa, el espectro no es simétrico en ese rango, indicando que la heptosa presente no es sedoheptosa o que la presencia de otros componentes en las muestras interfieren en la determinación.

Estos resultados indican que aún cuando es posible identificar un compuesto coloreado con el reactivo de Bial en las membranas tipo, R1 y R10, su migración cromatográfica no corresponde al testigo de sedoheptosa empleado. Además, los espectros obtenidos en la determinación analítico tampoco corresponden con los propios del testigo. Salton y Freer (164), mencionan la identificación de glucosa, manosa y galactosa y ribosa en la membrana tipo. Gilby y Col. (173), indican además la presencia de hexosaminas. Los resultados presentados en esta sección indican que no es posible detectar galactosa en los residuos de membrana extraí

dos con cloroformo-metanol. Este resultado es similar al de Gilby y Col. que sólo detectan trazas de galactosa en el residuo deslipidizado con éter. y sugiere, tal vez, que la galactosa sea un componente de los glicolípidos o que está presente en la membrana en concentraciones muy inferiores a los otros azúcares identificados. La presencia de hexosamina en el residuo de la membrana tipo, sugiere la presencia de glicolípidos, glicoproteínas o ácidos teicoicos.

También se detecta por cromatografía la existencia de otros azúcares no identificados por el análisis de los espectros. Estos azúcares permanecen además en los residuos finales obtenidos al extraer componentes de la membrana con el Método 2, método que en algunos pasos comprende la extracción de polisacáridos entre otros. Por todo ello, sugiere la existencia de glicolípidos, glicoproteínas, polisacáridos y, tal vez, ácidos teicoicos en los residuos de membrana tipo presentados en este trabajo.

Los residuos analizados de membranas R1 y R10 tienen los mismos azúcares que la membrana tipo, y las consideraciones anteriores se extienden, por consiguiente, a las mismas.

En los residuos de la membrana RS10, se identifica galactosa además de algunos otros de los azúcares mencionados. La presencia diferencial de galactosa en esta membrana y las propiedades antes discutidas en el análisis de las Tablas 17, 18, 19 y 20, apoyan la sugerencia de que en esta membrana existen diferentes compuestos conteniendo hidratos de carbón.

#### IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS E HIDRATOS DE CARBONO EN MEMBRANAS TIPO, R10, R1 Y RS10

La distribución electroforética de proteínas en membranas tipo y residual (similar a la membrana R1 de este trabajo) ha sido previamente investigada (153, 263) por otros autores, y no así la distribución electroforética de hidratos de carbono.

En esta sección, se presenta la distribución electroforética de estos componentes en las membranas tipo, R1, R10 y RS10 obtenidas como se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados de la Figura 42 indican la presencia de proteínas re-

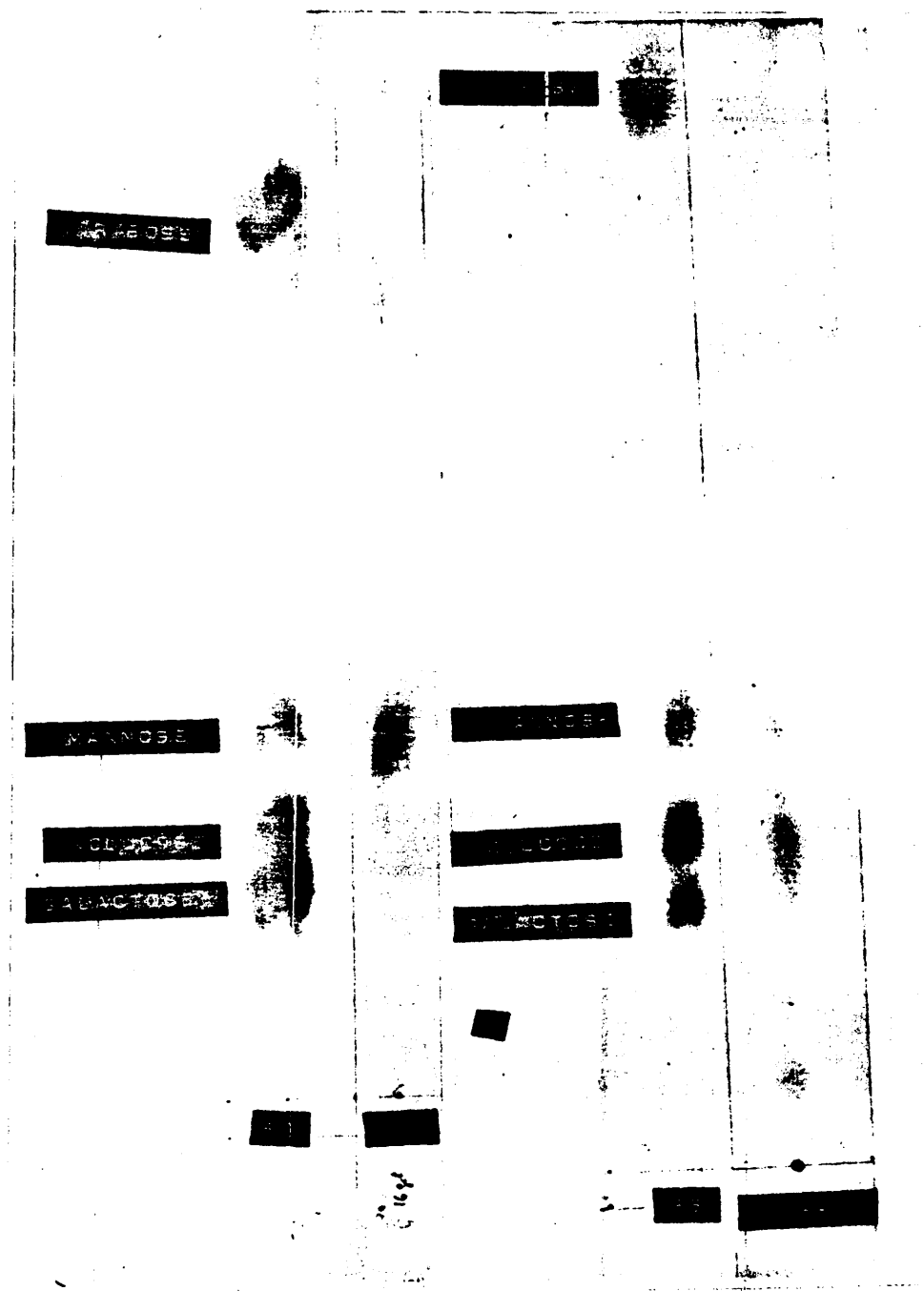


FIGURA 38

Identificación cromatográfica de azúcares reductores en membranas R1 y RS10. SS es el testigo de ribosa, manosa, glucosa y galactosa. MR1 es la fracción residual de membrana R1 al extraer lípidos con cloroformo-metanol. Las condiciones de hidrólisis son CIH 1N y 2 horas. MRS10 es la fracción residual de la membrana RS10 sobre la cual se efectúa idéntico procedimiento. Las condiciones de hidrólisis son CIH 1N y 2 horas.

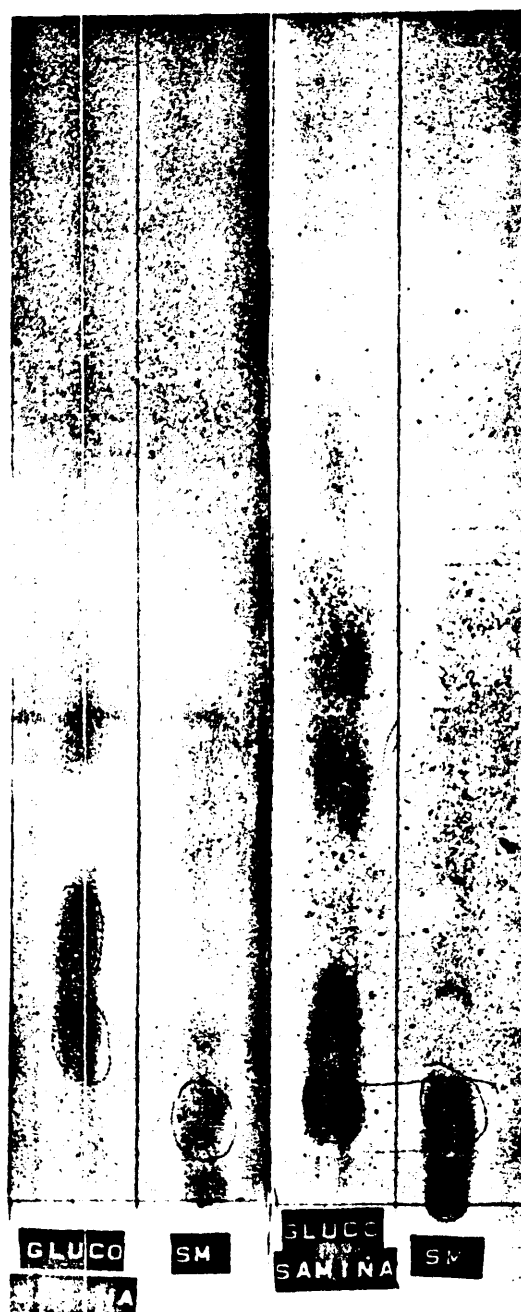


FIGURA 39

Identificación cromatográfica de hexosaminas en membrana tipo (SM).  
Efecto del tiempo de hidrólisis, *a* es 8 horas; *b* es 5 horas; el testigo  
es glucosamina.



FIGURA 40

Identificación de heptosas en membrana tipo R1 y R10 comparando con un testigo de sedoheptulosa. La identificación se hace en los residuos de extraer lípidos con cloroformo-metanol. MR1 es el residuo correspondiente a la membrana R1. SM es el residuo correspondiente a la membrana tipo y MR10 el residuo correspondiente a la membrana R10. Testigo de sedoheptosa marcado con lápiz. Las condiciones de hidrólisis son las siguientes: membrana R1 CIH 1N, 1,5 horas; membrana R10 CIH 1N, 1,5 horas; membrana tipo es CIH 2N, 2 horas.

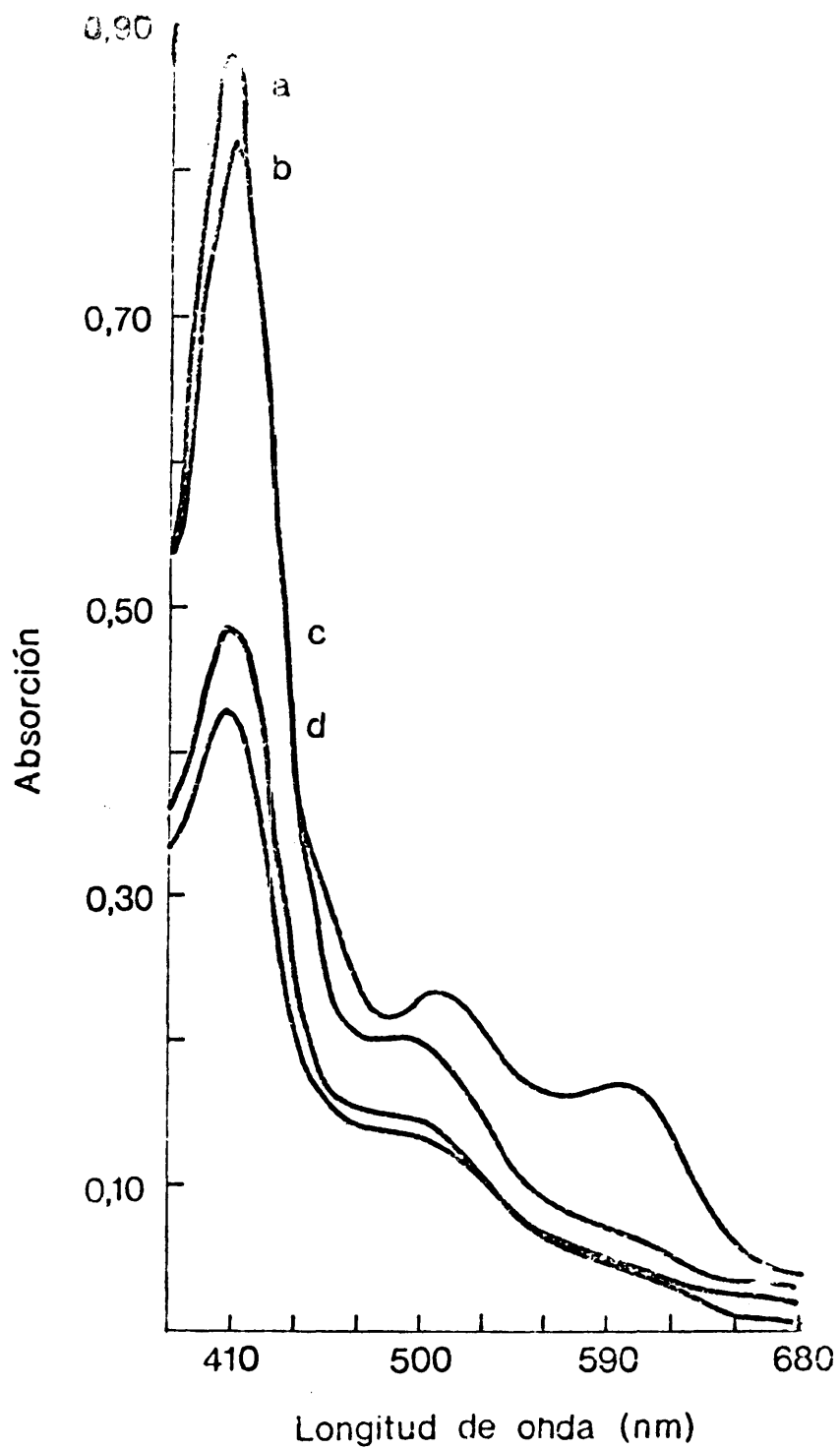


FIGURA 41

Identificación espectrofotométrica de heptosas en el residuo de membranas, *a* membrana tipo; *b* membrana RS10; *c* membrana R1; *d* membrana R10.

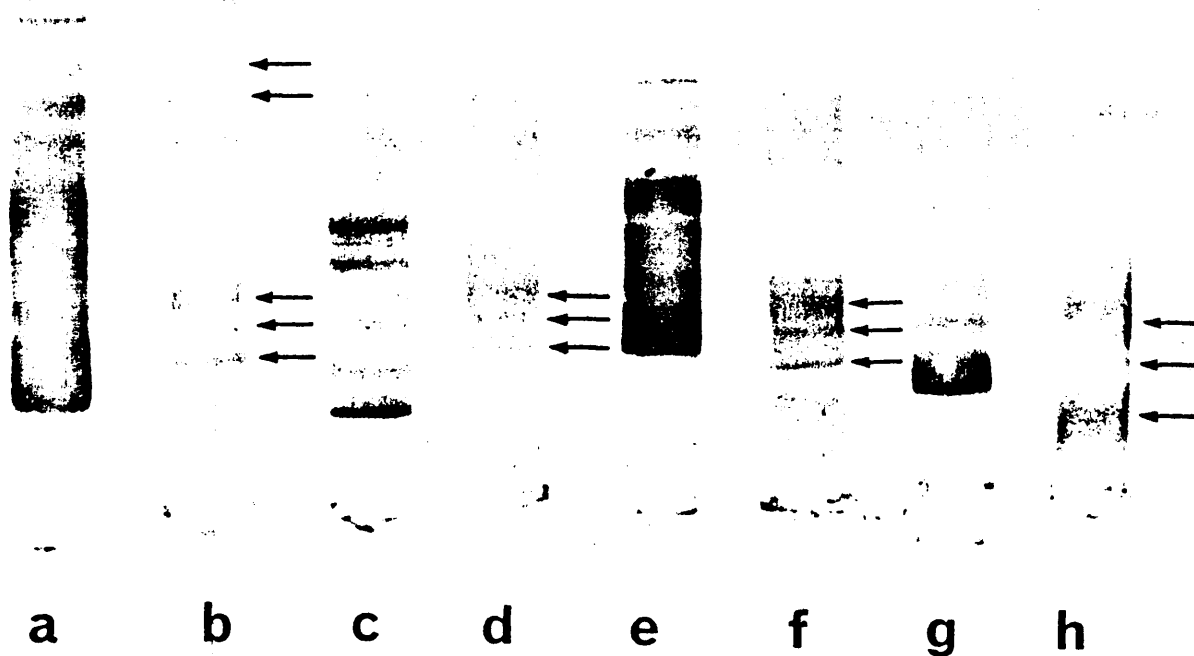


FIGURA 42

Identificación electroforética de proteínas e hidratos de carbono en membranas. Geles *a* (0,210 mg), *c* (0,400 mg), *e* (0,240 mg) y *g* (0,310 mg) de pesos secos respectivos de membranas tipo, R10, R1 y RS10 coloreadas con reacción de proteínas. Geles *b* (0,240 mg), *d* (0,400 mg), *f* (0,240 mg) y *h* (0,620 mg) correspondiendo a las membranas tipo, R10, R1 y RS10 coloreadas con la reacción de ácido periódico-fucsina. Los valores entre paréntesis corresponden a pesos secos. El material se disuelve en tampón conteniendo 1% de SDS. Para la electroforesis se emplean geles de poliacrilamida al 7% y 0,1% de SDS en el tampón.



tardadas (parte superior del gel) observables en la membrana tipo (gel *a*) y no detectadas en las membranas R10 (gel *c*) y RS10 (gel *g*). La distribución de materiales conteniendo hidratos de carbono, es la siguiente. En la membrana tipo (gel *b*) se identifican cinco bandas positivas a la reacción ácido periódico-fucsino dos de los cuales corresponden a compuestos retardados (parte superior del gel). Los componentes rápidos (tres bandas) se identifican, en cambio, en todas las membranas estudiadas. Las técnicas empleadas de electroforesis y coloraciones se detallan previamente.

## ESTIMACION CUANTITATIVA DE PROTEINAS Y LIPIDOS EN DIFERENTES TIPOS DE MEMBRANAS Y DISTRIBUCION ELECTROFORETICA DE LIPIDOS

El contenido de proteínas y lípidos en la membrana tipo y residual (R1) ha sido estudiado previamente (127, 169). Estos resultados se añaden en esta sección a los obtenidos para las membranas RS10 y R10 para facilitar la interpretación de los residuos.

Las técnicas empleadas para la determinación de proteínas y lípidos se detallan en la sección de Métodos.

Los resultados de la Tabla 23 indican el contenido de proteínas y lípidos en las membranas tipo, RS10, T1 y R10. Los valores obtenidos para las membranas tipo y R1 son semejantes a los obtenidos anteriormente por otros autores (127, 169). Si se comparan los datos de la membrana tipo con los de las restantes, se observa que la relación de proteínas a lípidos (membrana tipo 2,2; membrana RS10 1,7; membrana R10 1,5 y membrana R1 1) es independiente del diferente número de lavados (membrana RS10 y R10) pero función de la concentración de EDTA en los tiempos empleados (membranas R1 y R10 obtenidas con 1 y 10 mM de EDTA). En todos los casos se nota mayor eliminación de lípidos que de proteínas.

Las concentraciones de hidratos de carbono y ácidos nucleicos (ver Tablas 17 y 18) están afectadas por el método de obtención de las membranas. Se observa así una diferencia en la concentración de hidratos de carbono entre las membranas R10 y R1 que muestra el efecto de las dos concentraciones de EDTA empleadas. El número de lavados, afecta, en cambio, las concentraciones de ácidos nucleicos hallados en las membranas RS10 y R10.

TABLA 23

Membranas	% de Peso Seco	
	Proteínas	Lípidos
Tipo	40,2 (3)	18,3 (4)
RS 10	26,5 (3)	15,3 (3)
R 1	32,5 (2)	30,5 (2)
R 10	21,4 (1)	14,1 (2)

Contenido de lípidos y proteínas en membranas tipo, RS10 y R10. Los números entre paréntesis indican el número de preparaciones empleadas para hacer las determinaciones específicas de cada tipo de membrana.

La distribución electroforética de lípidos presentes en las membranas estudiadas se muestra en la Figura 43. Para la coloración de los geles se emplea el Método 2, mencionado en la sección de electroforesis en Métodos. Las membranas tipo (gel *a*), R10 (gel *b*) y R1 (gel *c*) parecen contener el mismo número de bandas (5-6) que es menor en la membrana RS10 (gel *d*).

El mayor número de bandas observado en la membrana tipo no coincide con el presentado previamente (300) por otros investigadores, y puede atribuirse a una mayor sensibilidad del método de coloración empleado en este caso. Se observa, sin embargo, en el transcurso de la electroforesis la presencia de una banda amarilla más rápida que el indicador y que desaparece durante la fijación del gel por cualquiera de los métodos en este trabajo.

La diferente movilidad de estas bandas y su detección en zonas donde también se revelan proteínas e hidratos de carbono, sugiere la presencia de glicolípidos, lipoproteínas o glicolipoproteínas, o complejos resistentes a la acción detergente del SDS presente en la electroforesis y necesario para la solubilización de las muestras de este estudio.

#### IDENTIFICACION ELECTROFORETICA DE PROTEINAS, LIPIDOS E HIDRATOS DE CARBONO EN MEMBRANAS TIPO Y EN SUS RESIDUOS CORRESPONDIENTES DESPUES DE LA EXTRACCION CON CLOROFORMO-METANOL. EFECTO DEL MERCAPTOETANOL

La membrana tipo fue extraída con cloroformo-metanol como se detalla en Métodos y Materiales. El residuo no se solubiliza con la solución al 1% de SDS y el tampón empleado en las condiciones experimentales antes mencionadas. Se disuelve, sin embargo, rápidamente con tampón conteniendo 1% de SDS y 0,5% de mercaptoetanol. La electroforesis se realiza en presencia de 0,1% de SDS y 0,05% de mercaptoetanol, manteniendo las demás condiciones.

A fin de estudiar el efecto del mercaptoetanol en la distribución electroforética de componentes en la membrana tipo, se comparan los resultados de la distribución electroforética de proteínas, hidratos de carbono y lípidos de soluciones de membrana tipo en tampón de Tris-glicocola y 1% de SDS con los resultados obtenidos cuando la misma membra-

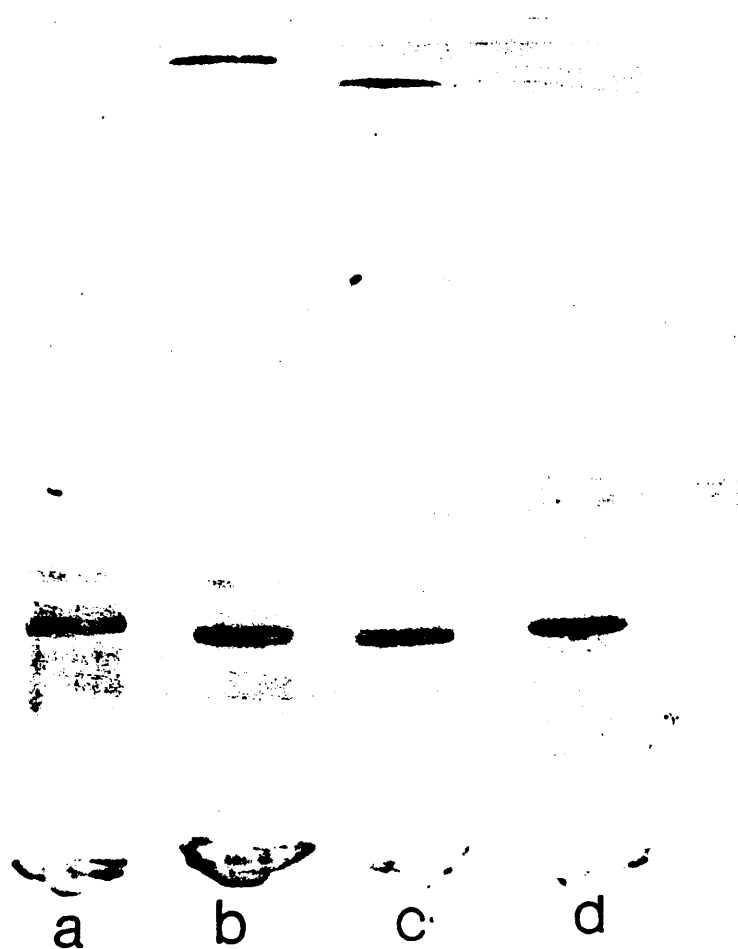


FIGURA 43

Identificación electroforética de lípidos en membranas. Gel *a* membrana tipo (0,300 mg), gel *b* membrana R10 (0,310 mg), gel *c* membrana R1 (0,240 mg) y gel *d* membrana RS10 (0,310 mg). Las cantidades indicadas entre paréntesis corresponden a pesos secos de cada muestra aplicada al gel. Las membranas se disuelven en tampón conteniendo SDS al 1%. Para la electroforesis se emplean geles al 7% de poliacrilamida en tampón con SDS al 0,1%. Las bandas visibles en la fotografía son de color naranja. Para más detalles experimentales ver Métodos y Materiales.

na se disuelve en el tampón que, además, contiene mercaptoetanol 0,5 M. La electroforesis se realizan también en geles al 7%, y los tampones empleados contienen SDS (0,1%) y/o 0,05% de mercaptoetanol respectivamente. Se colorean luego para revelar proteínas, lípidos e hidratos de carbono como se indica en Métodos, empleándose el Método 2 para la identificación de lípidos.

La Figura 44 muestra la distribución de proteínas (gel A), lípidos (gel B) e hidratos de carbono (gel C) en la solución de membrana tipo disuelta en tampón conteniendo SDS solamente. Los geles D (coloración de proteínas), E (coloración de hidratos de carbono) y F (coloración de lípidos), muestran el efecto del mercaptoetanol en la solución de la misma membrana disuelta con tampón conteniendo además mercaptoetanol. Se observa una disminución del número e intensidad de coloración de proteínas (geles A y D) cuando la membrana se trata con mercaptoetanol. En los hidratos de carbono (geles C y E) el efecto parece ser el de aumentar la intensidad de las bandas más rápidas; para los lípidos, en cambio, (geles B y F) se nota un aumento de bandas especialmente en la sección superior del gel.

Recientemente se ha señalado que la reacción de ácido periódico y fucsina es capaz de colorear también fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, 301). Si éste fuera el caso, algunas de las bandas identificadas por nosotros como conteniendo azúcares podrían ser en realidad fosfolípidos o complejos que los contienen.

La distribución electroforética de los componentes presentes en el residuo de la membrana tipo extraída con cloroformo-metanol se compara luego con los de la membrana sin extraer. En la Figura 45, los geles A, B y C indican la distribución electroforética de proteínas, hidratos de carbono y lípidos en la membrana tipo disuelta en tampón conteniendo SDS y mercaptoetanol. Los geles D, E y F muestran la distribución de los mismos componentes en el residuo libre de lípidos, también disueltos en igual tampón. Se observa que la extracción de lípidos, de la membrana induce un aumento de las bandas rápidas de proteínas (gel D) en relación con las observadas en la solución inicial (gel A). La distribución de hidratos de carbono (geles B y E) presenta diferencias, sobre todo en la intensidad de la banda rápida. La distribución de lípidos, (geles C y F) indica, en cambio, una reducción en la intensidad y número

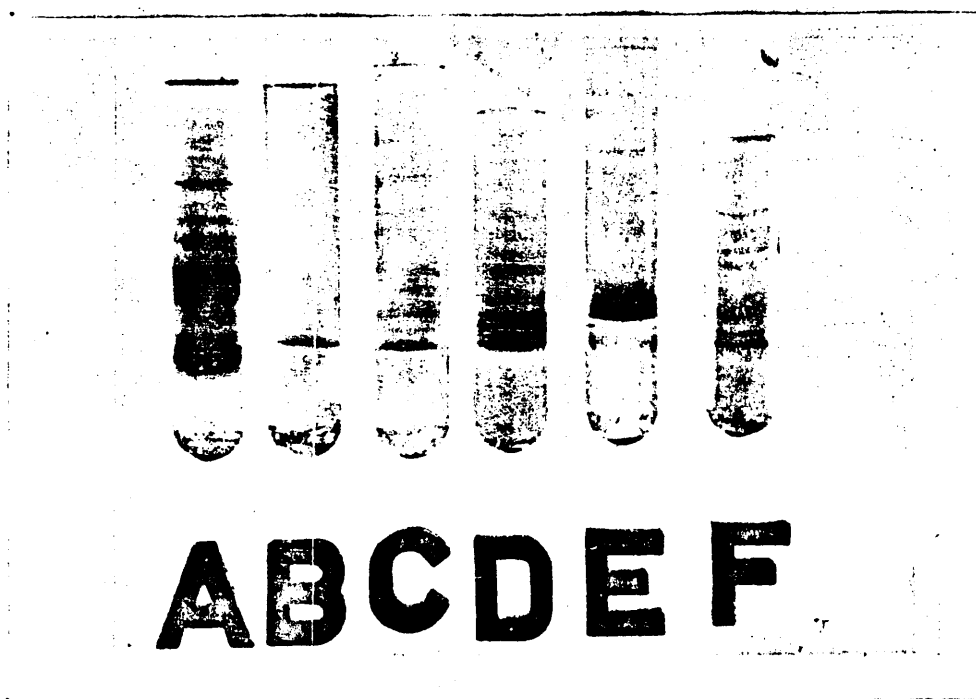


FIGURA 44

Efecto del mercaptoetanol en la distribución electroforética de proteínas, lípidos e hidratos de carbono de soluciones de membrana tipo. Gel A (0,300 mg) teñido para identificar proteínas, gel B (0,300 mg) revelado con Sudan III (bandas de lípidos de color naranja) y gel C (0,300 mg) relevado con ácido periódico y fucsina para identificar hidratos de carbono (color rojo). La membrana tipo se disuelve en tampón conteniendo SDS al 1%. El gel D (0,250 mg) y los geles E y F (0,300 mg) corresponden a las tinciones para identificar proteínas, hidratos de carbono y lípidos de la solución de membrana tipo disuelta en tampón con SDS al 1% y mercaptoetanol al 0,5%. Las electroforesis se realizan en geles de poliacrilamida al 7%, y tampón con SDS al 0,1% para las dos electroforesis y, además, con 0,05% de mercaptoetanol para el estudio de los geles D, E y F. Los números entre paréntesis corresponden a pesos secos.

de bandas, pero no la desaparición de las mismas que era de esperar como resultado de la extracción de lípidos.

Cabe destacar que las soluciones de residuos aplicadas a los geles D, E y F no presentan la coloración amarilla característica de la solución de membrana, ni se nota en el transcurso de sus electroforesis la presencia de la banda amarilla rápida presente en la membrana tipo, y descrita por Salton (93). Estos lípidos no se detectan ya que difunden durante la fijación de los geles. La presencia de bandas que se colorean con Sudan III distribuida a lo largo del gel, sugiere la existencia de lípidos (extracción incompleta de los mismos), glicolípidos o glicolipo<sub>u</sub> proteínas, o complejos, con variaciones de sus pesos moleculares o de su contenido en hidratos de carbono.

Los resultados de estos experimentos indican que el mercaptoetanol modifica las propiedades electroforéticas de los componentes estudiados. Con referencia a los hidratos de carbono cabe destacar la posibilidad de la existencia de una glicoproteína en la que el polisacárido esté unido a la cisteína de la proteína, por una unión S-glicosídica, similar a la observada en eritrocitos (272) sensible a la acción reductora del mercaptoetanol.

En otras secciones de esta tesis se ha intentado analizar el efecto de los detergentes y de los agentes reductores (ditiotionito sódico y mercaptoetanol) sobre las proteínas, la presencia de componentes con cadenas de hidrocarburos no saturadas (carotenos y menaquinonas) y sus posibles interacciones en la electroforesis de la membrana R1. Similares conclusiones pueden extenderse para el análisis de los resultados presentados en estos experimentos.

La solución inicial de la membrana tipo, contiene los lípidos y los carotenos y menaquinonas descritos por Salton y colaboradores (165, 168, 263, 93, 166, 173). La presencia de proteínas sensibles a la reducción por mercaptoetanol se deduce de la disminución del número de bandas observables en los geles correspondientes de la Figura 44 (geles A y D). Tanto el mercaptoetanol como las proteínas reducidas con sus grupos SH libres, podrían reaccionar con las cadenas no saturadas de las menaquinonas o de los carotenos, formando sulfhidril-olefinas lábiles. Estas reacciones podrían, en parte, ser la causa de la distribución observada en los lípidos a lo largo del gel. Parte de los resultados podrían ser

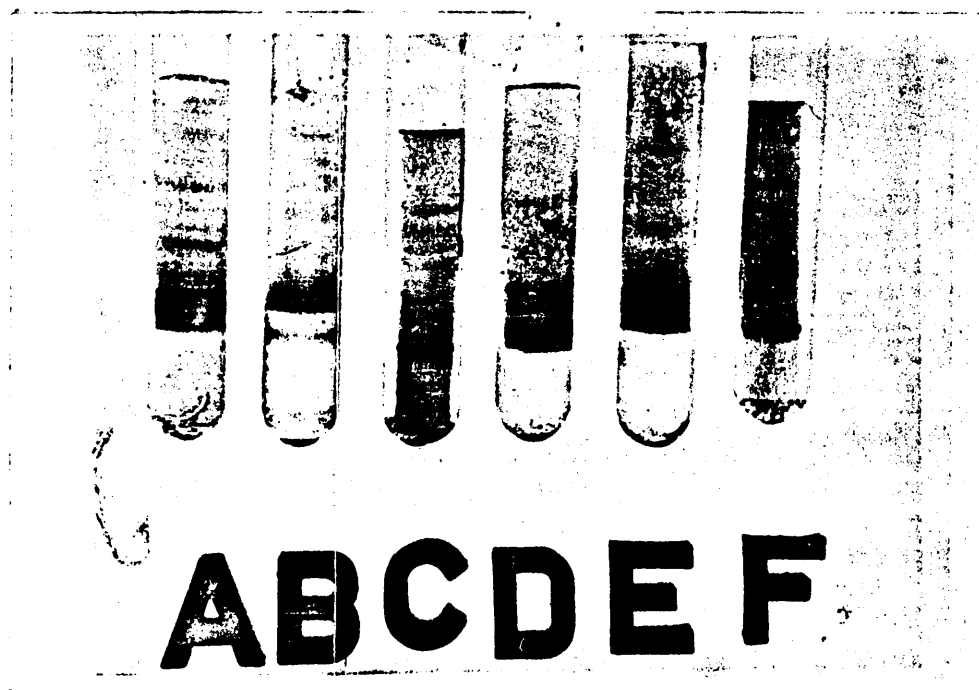


FIGURA 45

Comparación de la distribución electroforética de membranas tipo y su residuo después de la extracción con cloroformo-metanol. Los geles A, B y C (0,300 mg de peso seco) corresponden a las tinciones de proteínas, hidratos de carbono y lípidos, respectivamente, de la solución de membrana disuelta en tampón conteniendo SDS al 1% y mercaptoetanol al 0,5%. Geles D, E y F (0,300 mg de peso seco) muestran las coloraciones de proteínas, hidratos de carbono y lípidos del residuo de la extracción con cloroformo-metanol. Estos residuos se disuelven también en tampón con SDS y mercaptoetanol. Las electroforesis se realizan en geles de poliacrilamida al 7% y tampones con SDS al 0,1% y mercaptoetanol al 0,05%.



debidos a la metodología empleada, y no representarían los componentes lipídicos reales de la misma.

Con similar razonamiento, y asumiendo que son las menaquinonas y los carotenos los componentes más fácilmente extraíbles con el procedimiento empleado (ver extracción de lípidos con cloroformo-metanol en Métodos) puede explicarse el menor número de bandas observadas cuando los residuos de la membrana se disuelven en tampón con SDS y mercaptoetanol y se analizan por electroforesis. La eliminación parcial de las reacciones antes indicadas son el reflejo del contenido real de glicolípidos, lipoproteínas o glicolipoproteínas de la membrana tipo.

## EXTRACCION DE POLISACARIDOS DE MEMBRANAS RS10

Los resultados de las investigaciones de algunos capítulos anteriores, sugieren la presencia de polisacáridos. La membrana RS10 resulta interesante para este análisis, pues presenta el mismo contenido de hidratos de carbono que la membrana tipo, pero de diferentes propiedades.

El método de extracción de polisacáridos utilizado se describe en la sección de Métodos y Materiales. El análisis electroforético de los extractos obtenidos intenta determinar las bandas de hidratos de carbono correspondientes a polisacáridos.

La distribución electroforética de proteínas e hidratos de carbono de la solución inicial de membrana del extracto conteniendo polisacáridos, y del residuo correspondiente aparecen en la Figura 46. Los geles A y B muestran la distribución electroforética de proteínas y azúcares de la membrana inicial. Los geles C y D son las mismas reacciones en los extractos conteniendo polisacáridos, y los geles E y F identifican esos componentes en el residuo. Este último, sólo se disuelve si el tampón contiene mercaptoetanol (0,5%) y esta muestra, por lo tanto, se analiza por electroforesis en presencia del 0,05% del mismo. Las soluciones aplicadas a los geles A, B, C y D sólo contienen SDS y la electroforesis se realiza con el 0,1% del mismo en el tampón. Los resultados indican que de las cuatro bandas conteniendo azúcares en la membrana inicial (gel B) sólo se detecta una en el extracto conteniendo el polisacárido (gel D) en la que, además, sólo se observa una banda muy débil de proteína (gel C). La mayor parte de las proteínas se recuperan en el se

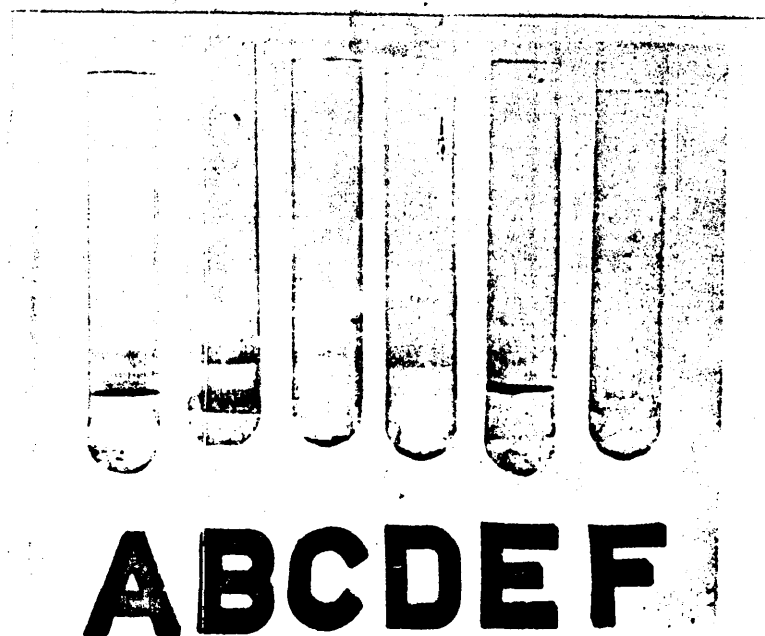


FIGURA 46

Distribución electroforética de proteínas e hidratos de carbono en una solución de membranas RS10 y en las fracciones resultantes de la extracción de polisacáridos. Geles A y B: tinción de proteínas e hidratos de carbono. La muestra para los geles A y B se disuelven en tampón conteniendo SDS al 1%. Los geles C y D corresponden al extracto de TCA luego de extraer el ácido con éter. Los geles E y F corresponden a las coloraciones de proteínas e hidratos de carbono del residuo. Los cuatro últimos geles fueron analizados en tampones conteniendo 1% de SDS y 0,05% de mercaptoetanol.

dimento (gel E) pero se observa diferencia en la distribución de bandas respecto de la solución inicial (gel A). Esta fracción contiene solamente un ligero vestigio de hidratos de carbono, como se observa en el gel F. El resultado de esta investigación permite comprobar la existencia de polisacáridos en la membrana, aún cuando no permite la identificación de la banda correspondiente de migración en la solución inicial de la misma. La necesidad de agregar mercaptoetanol para la disolución del sedimento de la extracción de polisacáridos, podría efectar la distribución de los glicolípidos o glicoproteínas en forma similar a la considerada para membranas tipo, produciendo por ejemplo, en algunos casos, fracciones de bajo peso molecular capaces de migrar más rápidamente que el indicador y salir fuera del gel.

## CONCLUSIONES

- 1.- Es posible obtener diferentes tipos de membranas mediante pequeñas variaciones de las condiciones preparativas. El número de lavados, y la concentración de EDTA empleada en los tampones, permite describir la preparación de dos membranas de *Micrococcus lysodeikticus* diferentes de las membranas tipo y residual obtenidas previamente.
- 2.- Es posible solubilizar totalmente la membrana residual R1 con tampones ligeramente ácidos y en presencia de detergentes.
- 3.- Es posible mantener las proteínas en solución y extraer los lípidos en *n*-butanol. La máxima recuperación de proteínas solubles libres de lípidos se consigue por adición de iodoacetamida a la solución inicial.
- 4.- El estudio electroforético de las proteínas solubilizadas a partir de esta membrana indica que las bandas de movilidad intermedia (porción media del gel) varían en función de la reducción con ditionito sódico, y la concentración de iodoacetamida. También se observan diferencias atribuibles a la concentración de electrolitos presentes en la muestra analizada.
- 5.- La presencia de iodoacetamida modifica la absorción específica de la solución de membrana residual R1, observándose un incremento en la absorción ultravioleta. El espectro visible indica la pérdida de algunos citocromos.
- 6.- La determinación de grupos -SH libres en la solución de proteínas de la membrana R1 indica la presencia de grupos libres de cisteína en estas proteínas, cuya alquilación con iodoacetamida facilita la obtención de proteínas solubles de la misma (ver punto 3).

- 7.- Se determinan los pesos moleculares de las proteínas de la membrana R1 en solución libre de lípidos. Los valores encontrados varían en el rango de 17.000 a 75.000. Se separan de 9 a 11 bandas, y no existen ninguna en concentración mayoritaria.
- 8.- Es posible fraccionar proteínas, ácido ribonucleico y componentes conteniendo hidratos de carbono y lípidos, de la solución de membrana R1 tratada con *n*-butanol para la extracción de los lípidos. El fraccionamiento se realiza por criba molecular en Sephadex G-200. La presencia de estos lípidos residuales indica que la extracción no es completa, y sugiere la presencia de glicolípidos o glicolipoproteínas entre otros compuestos.
- 9.- Es posible estimar ribosa, fósforo y hexosas en la solución de membrana R1 libre de lípidos por el tratamiento con *n*-butanol.
- 10.- Es posible fracciones componentes de estas soluciones con el uso de membranas de Amicón. Estas membranas separan componentes en función de sus pesos moleculares. Las membranas Amicón empleadas, permiten separar la mayor parte de las proteínas con sólo la tercera parte de los hidratos de carbono. Este resultado da validez a las determinaciones de pesos moleculares por electroforesis.
- 11.- Se determinan ácidos ribonucleicos en la membrana tipo y en las diferentes membranas residuales. La determinación se realiza después de utilizar dos procedimientos diferentes de extracción de los mismos. Se identifica, además, ribosa observando los espectros de fracciones que la contienen, empleando la reacción de orcinol o de sulfúrico y cisteína.
- 12.- Se identifica la presencia de ácidos ribonucleicos en todas las membranas por electroforesis en geles de poliacrilamida. El análisis de las membranas antes y después de su tratamiento con ribonucleasa permite corroborar la presencia de los mismos en todas las membranas.
- 13.- Se determinan las hexosas cuantitativamente en todas las membranas obtenidas. La determinación se realiza en los residuos libres de lípidos de las membranas liofilizadas. Se observa que parte de estos azúcares se pierde en la fracción orgánica (cloroformo-metanol), pero parte puede recuperarse por lavados acuosos de la misma.

- 14.- Se observa que los compuestos azucarados pueden extraerse con diferentes solventes, como ácido tricloroacético, alcohol etílico y alcohol acidificado con ácido perclórico. La diferente distribución de los mismos indica que los procedimientos empleados para la obtención de las membranas influyen en la composición y propiedades de los azúcares respectivos.
- 15.- El análisis espectrofotométrico de los azúcares mediante las reacciones de orcinol y ácido sulfúrico y cisteína confirma la presencia de hexosas y pentosas en estas fracciones, así como de otros azúcares no específicamente identificados. El análisis cromatográfico de los residuos libres de lípidos de las diferentes membranas indica la presencia de manosa y glucosa en todas las membranas, la ribosa se identifica en la membrana tipo, R1 y R10 y la galactosa en la membrana RS10. También se identifican hexosaminas en las membranas tipo, R10 y R1. El reactivo de Bial da manchas violáceas o verdosas en la membrana tipo, R10 y R1, aún cuando el azúcar no pudo ser identificado.
- 16.- El análisis electroforético de soluciones de diferentes membranas también permite la identificación de bandas conteniendo hidratos de carbono. El número de bandas observado en la solución de membrana tipo es mayor que en las restantes membranas. La membrana RS10 que contiene la misma concentración de hidratos de carbono que la membrana tipo presenta menor número de bandas de rápida movilidad en los geles.
- 17.- Se presenta un método de fijación de geles como paso previo a la identificación de bandas conteniendo lípidos. Este método identifica un mayor número de las mismas.
- 18.- Se estudia el efecto del mercaptoetanol en la electroforesis de una solución de membrana tipo. La identificación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos en la solución de membranas con o sin aquel reactivo indica modificaciones en las propiedades electroforéticas de los mismos.

- 19.- Se identifican por electroforesis hidratos de carbono, lípidos y proteínas en los residuos de la membrana tipo obtenidos al extraer lípidos con cloroformo-metanol. La presencia de lípidos indica que componentes que los contiene deben ser identificados como glicolípidos, lipoproteínas o glicolipoproteínas (no extraíbles por el solvente).
- 20.- Se identifican y extraen polisacáridos de la membrana Rsl0. Estos compuestos probablemente estarán presentes en las otras membranas residuales estudiadas, particularmente la R10 ya que la mayor parte de sus azúcares se recuperan en la fracción extraída con ácido tricloroacético, alcohol perclórico y alcohol.

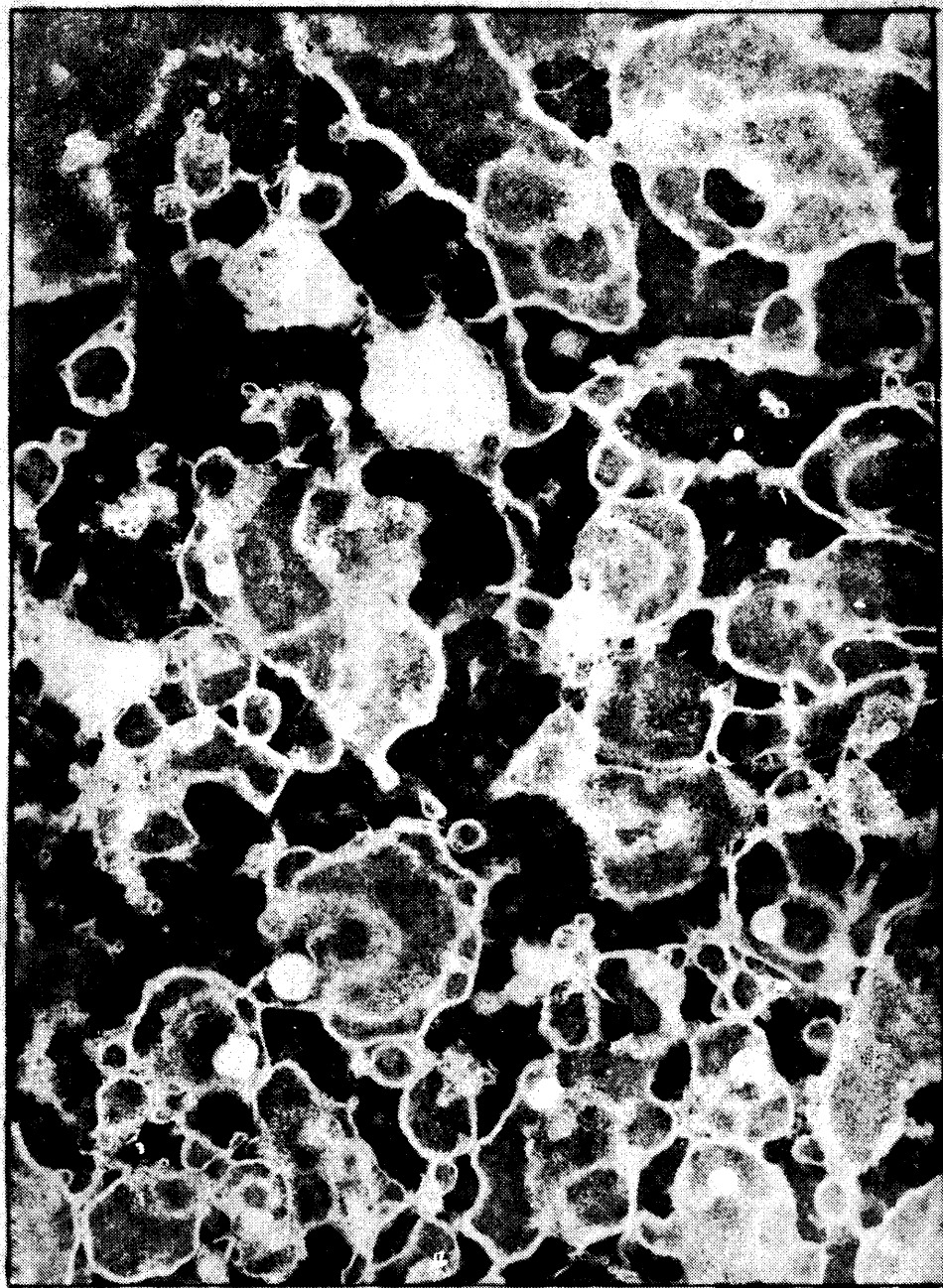
## APENDICE

Se incluyen dos fotografías de las membranas R10 y RS10 preparadas para su observación en el microscopio electrónico por el Dr. D. Juan Anonio Leal. Estas fotografías corresponden a una ampliación de 72.000 veces.

Fotografías de la membrana tipo pueden verse en M.R.J. Salton y J.A. Chapman (170) y de la membrana residual semejante a la R1 de este trabajo en M.S. Nachbar y M.R.J. Saltón (127).



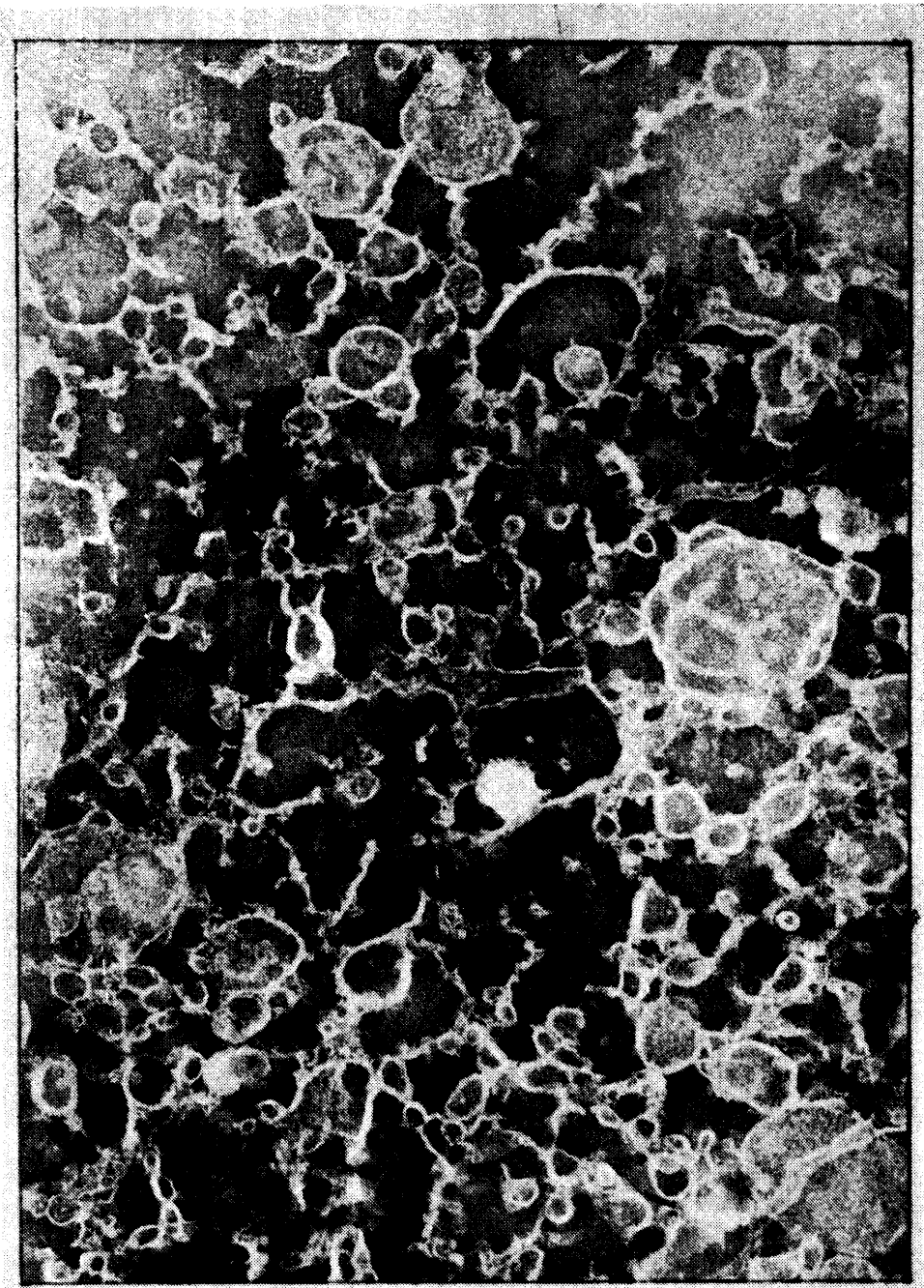




APENDICE FIGURA 1

Fotografía obtenida en el microscopio electrónico de la membrana residual R10 ampliificada 72.000 veces.





APENDICE FIGURA 2

Fotografía obtenida en el microscopio electrónico de la membrana residual RS10 ampliificada 72.000 veces.



## BIBLIOGRAFIA

- (1) H. DE VRIES, 1885, Jb. Wiss Bot. 16, 465.
- (2) W. PFEFFER, 1897. The Physiology of Plants, traducido por A. Ewart, Oxford Claredon Press.
- (3) E. OVERTON, 1899. Vjsch Naturforsch Ges., Zurich 40, 159.
- (4) J.Q. PLOWE, 1931. Propoplasma, 12, 196.
- (5) E. GORTER, F. GRENDL, 1925. J. Expo. Med. 41, 439.
- (6) J.F. DANIELLI, H.A. DAVSON, 1935. J. Cell. Comp. Physiol. 5, 495.
- (7) J.D. ROBERTSON, 1959. Biochem. Soc. Symp. Symp. (Cambridge, Inglaterra), 16, 3.
- (8) E.D. KORN, 1966. Siencie, 153, 1491.
- (9) E.D. KORN, 1969. Fed. Proc. 28, 6.
- (10) M. KATES, M.K. WASSEF, D.J. KUSHNER, 1968. en Membrane Models and the Formation of Biological Membranes, Proc. of the 1967 meeting of the International Conference on Biological Membranes, Ed. por L. Bolis y B.A. Pethica, pag. 105, North Holland Pu. Amsterdam.
- (11) G. VANDERKOOI, D.E. GREEN, 1971. Bioscience 21, 409.
- (12) J. CAIN, G. SANTILLAN, J.K. BLASIE en Membrane Research, First ICN, UCLA, Symp. on Molecular Biology, Ed. C.F. Fox, 1972, pag. 3. Academic Press, New York y Londres.
- (13) M. EDIDIN, 1972, en Membrane Research, First ICN, UCLA Symp. on Molecular Biology, Ed. C.F. Fox, 1972, pag. 15, Academic Press New York y Londres.
- (14) H. DEMUS, E. MEHL, 1970. Biochim. Biophys. Acta 196, 20.
- (15) A.H. MADDY, 1966. Biochim. Biophys. Acta 117, 193.
- (16) O.O. BLUMENFELD, P.M. CALLOR, C. HOWE, L.T. LEE, 1970. Biochim. Biophys. Acta 211, 109.
- (17) P.J. CURTIS, 1969. Biochim. Biophys. Acta 183, 235.
- (18) J. LENARD, 1970. Biochemistry 9, 1129.

- (19) M.T. LAICO, E.I. RUOSLAHTI, D.S. PAPERMASTER, W.J. DREYER, 1970. Proc. Ntl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 120.
- (20) A.H. MADDY, P.G. KELLY, 1971. Biochim. Biophys. Acta 241, 290.
- (21) R.A. CAPALDI, D.E. GREEN FEBS Lett. 1972, 25, 205.
- (22) S.J. SINGER, G.L. NICHOLSON, 1972. Science, 175, 720.
- (23) M.S. BRETSCHER, 1971. Nature, New Biol. 231, 229.
- (24) T.L. STECK, en Membrane Research, First ICN-UCLA Symposium on Molecular Biology Ed. C.F. Fox pag. 71 Academic Press New York, Londres.
- (25) D. BRANTON, D.W. DEAMER, Membrane Structure 1972, Springer-Verlag, Wien, New York, pag. 41.
- (26) S.A. ROSENBERG, G. GUIDOTTI, 1968. J. Biol. Chem. 244, 5118.
- (27) S. SPATZ, P. STRITTMATER, 1971. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1042.
- (28) T.L. STECK, C.F. Fox. En Membrane Molecular Biology, 1972, pag. 50 Ed. C. Fred. A. Kleath Sanauer Ass. Stanford Conn.
- (29) D.E. GREEN, E. BACHMANN, D.W. ALLMAN, J.F. PERDUE, 1966. Arch. Biochem. Biophys. 115, 172.
- (30) T.P. SINGER, 1968. en Biological Oxidations, Ed. T.P. Singer, pag. 399, Wiley (Interscience) New York.
- (31) R.S. CRIDDLE, R.M. BOCK, D.E. GREEN, H. TISDALE, 1962. Biochemistry, 1, 827.
- (32) A. TZAGOLOFF, 1969. J. Biol. Chem. 244, 5020.
- (33) F.S. SJOSTRAND, 1963. J. Ultrastruc. Res. 9, 340.
- (34) D.E. GREEN, N.D.W. ALLMAN, E. BACHMANN, H. BAUM, K. KORCZYK, E.F. KOPMAN, S. LIPTON, C.H. McLENNAN, D.G. McCONNEL, J.F. PERDUE, J.S. RIESKE, A. TZAGOLOFF, 1967. Arch. Biochem. Biophys., 119, 312.
- (35) A.A. BENSON, S.J. SINGER, 1965. Amer. Chem. Soc. Abstracts of Papers, 150, 8c.
- (36) S.J. SINGER, 1971. en Structure and Function of Biological Membranes. Ed. L.I. Rothfield, pag. 169. Academic Press, New York y Londres.
- (37) H. FERNANDEZ MORAN, T. ODA, P.V. BLAIR, D.E. GREEN, 1964. J. Cell. Biol. 22, 63.
- (38) Y. KAGAWA, E. RACKER, 1966. J. Biol. Chem. 241, 2475.
- (39) D.E. GREEN, J.F. PERDUE, 1966. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1295.
- (40) J. LENARD, S.J. SINGER, 1966. Proc. Natl. Acad. Sci., 56, 1828.
- (41) D.F. WALLACH, A. GORDON, 1967. en Protides of the Biological Fluids pag. 47. H. Peeteres New York, Elsevier.
- (42) J.M. FESSENDEN-RADEN, E. RACKER en Structure and Function of Biological Membranes, 1971. Ed. L.I. Rothfield, pag. 432, Academic Press New York y London.

- (43) F.S. SJOSTRAND on Enn Membranes, Boological and Pathological Aspects, 1971. pag. 1, The Amer. Assoc. of Pathologists and Bacteriologists.
- (44) T.M. TERRY, D.M. ENGELMANN, H.J. MOROWITZ, 1967. Biochim. Biophys. Acta 135, 391.
- (45) D.M. ENGELMANN, H.J. MOROWITZ, 1968. Biochim. Biophys. Acta 150, 376.
- (46) H. HAYASI, 1969. Acta Med. Okayama, 23, 237.
- (47) P. ZAHLER, E.R. WIBEL, 1970. Biochim. Biophys. Acta 219, 320.
- (48) C.R. HACKERBROCK, 1972. Ann. N.Y. Acad. Sci. 195, 492.
- (49) S.H. RICHARDSON, H.O. HULTIN, D.E. GREEN, 1963. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 50, 821.
- (50) S.H. RICHARDSON, H. HULTIN, S. FLEISCHER, 1964. Arch. Biochem. Biophys., 105, 254.
- (51) R.S. CRIDDLE, D.L. EDWARDS, T.G. PETERSON, 1962. Biochemistry, 827, 842.
- (52) R.S. CRIDDLE, 1969. Ann. Rev. Plant, Physiol. 20, 239.
- (53) C.W. COTMANN, H.R. MAHLER, T.E. HUGLY, 1968. Arch. Biochem. Biophys. 126, 821.
- (54) K. GOT, G.M. POLYA, L.M. COCKERILL, 1967. Biochim. Biophys. Acta 135, 225.
- (55) A.H. MADDY, 1964. Biochim. Biophys. Acta 88, 448.
- (56) A. MARTONOSI, 1969. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 1039.
- (57) W.J. DREYER, S. PAPERMASTER, H. KUHN, 1972. Ann. N.Y. Acad. Sci. 195, 61.
- (58) D.F.H. WALLACH, en 22 Colloquium del Gesellschaft fur Biol. Chem. 1971, pag. 15, Ed. Spriger-Verlag Berlin.
- (59) J.M. GRAHAM, D.F.H. WALLACH, 1969. Biochim. Biophys. Acta 193, 225.
- (60) J.M. GRAHAM, D.F.H. WALLACH, 1971. Biochim. Biophys. Acta 241, 180.
- (61) J.P. CHANGEUX, en Nobel Symp 11, Symmetry and Function of Biological Systems at Molecular Level. Ed. A. Engelstrom, B. Strndberg, pag. 236, Wiley, New York,
- (64) R. BLUMENTHAL, J.P. CHANGEUS, R. LEFEVRE, 1970. J. Mol. Biol. 2, 351.
- (65) D.E. KOSHLAND, G. NEMETHY, D. FILMER, 1966. Biochemistry 5, 365.
- (66) G. WEBER, 1972. Biochemistry 11, 864.
- (67) V. LUZATTI, III Curso de Biología Molecular, Estructura y Función de Membranas, 1970, pág. 98. Ed. Universidad Complutense, Madrid.
- (68) D. BRANTON, 1966. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 55, 104.
- (69) D. BRANTON, 1967, Exp. Cell. Res. 45, 703.
- (70) L. PACKER, 1972. Bioenergetics, 3, 115.



- (71) T.O. CASPERSSON, en Cell Growth and Cell Function, 1950, pag. 96, W.W. Norton Co. Inc. New York.
- (72) J. BRACHET, en The Nucleic Acids, Ed. E. Chargaff, J.N. Davidson. Vol. III. pág. 486. Academic Press, New York y London.
- (73) P.C. ZAMECNIK, E.B. KELLER, 1954. J. Biol. Chem. 209, 337.
- (74) M.B. HOGLAND, 1960, en The Nucleic Acids, Ed, E. Chargaff, J.N. Davidson, Vol. III, pag. 340. Academic Press, New York y London.
- (75) G.E. PALADE, 1955. J. Biophys. Biochem. Citol. 1, 59.
- (76) B. ATTARDI, B. CRAVIOTO, G. ATTARDI, 1969. J. Mol. Biol. 44, 47.
- (77) D.D. SABATINI, Y. TASHIRO, G.E. PALADE, 1966. J. Mol. Biol. 19, 503.
- (78) M. ROSBACH, S. PENMAN, 1971. J. Mol. Biol. 59, 227.
- (79) E. PALAT, R. GOL, P. LOUSIOT, 1971. Comp. Biochem. Phys, 39B, 843.
- (80) M.C. GANOZA, C.A. WILLIAMS, 1969. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63, 1370.
- (81) S.J. HICKS, J.W. DRYSDALE, H.N. MUNRO, 1969. Science, 164, 584.
- (82) C.M. REDMAN, 1969. J. Biol. Chem. 244, 4308.
- (83) P. SIEKEVITZ, G.E. PALADE, 1960. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 619.
- (84) S.D. WAINWRIGHT, J.C. THOMPSON, J.F. PRCHAL, H.M. TSAY, 1972. Cand. J. Biochem, 50, 1056.
- (85) F.S. ROLLESTON, D. MAK, 1973. Biochem., J. 131, 851.
- (86) V. GINSBURG, E.F. NEUFELD, 1969. Ann. Rev. Biochem. 38, 371.
- (87) R.G. SPIRO, 1970. Ann. Rev. Biochem. 39, 599.
- (88) D.M. CARLSON, E.J. MCGUIRE, G.W. JOURDIAN, S. ROSEMAN, 1964. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Expo. Biol. 23, 380.
- (89) E.J. MCGUIRE, S. RESEMAN, 1967. J. Biol. Chem. 242, 3745.
- (90) R.W. HENDLER, 1968, en Protein Biosynthesis and Membrana Biochemistry, Wiley, New York.
- (91) P.N. CAMPBELL, 1970. FEBS Lett. 7, 1.
- (92) D.M. NEVILLE, J.H. GLOSSMANN, 1971. J. Biol. Chem. 246, 6335.
- (93) M.R.J. SALTON, en Biomembranes. Ed. L.A. Manson, 1971, pag. 1. Plenum Press,
- (94) R.M. PFESTER, D.G. LUNDGREN, 1964. J. Bacteriol. 88, 1119.
- (95) D. SCHLESSINGER, V.T. MARCHESI, B.C.K. KWAN, 1965. J. Bacteriol. 90, 456.
- (96) M.R.J. SALTON en The Specificity of Cell Surfaces, 1967, Ed. Davis, and Warren, pag. 71, Prentice Hall Englewood Cliffs.
- (97) E. KELLERMBERG, A. RYTER, J. SECHLAUD, 1958. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4. 323.

- (98) A.M. GLAUERT, H.J. THORNLEY, 1969. *Ann. Rev. Microbiol.* 23, 199.
- (99) J.H. FREER, M.R.J. SALTON, 1970. en *Microbial Toxins*, Ed. S.J. Ajl. G. Weinbaum, S. Kadis, Academic Press, New York.
- (100) O. LUDERITZ, K. JANN, R. WHEAT, 1968. *Comprehensive Biochemistry* de M. Floorkin, E.H. Stoz, Eds. pag. 105 American Elsevier Pu. C. New York.
- (101) J.M. GHUYSEN, J.M. STROMINGER, D.J. TIPPER, *Bacterial Cell Walls* en *Comprehensive Biochemistry* Eds. Florkin, Stoz, Vol. 26A, pag. 53, 1968. Elsevier, London, New York.
- (102) V. BRAUN, U. SCHWARZ, 1969. *J. Gen. Microbiol.* 57, iii.
- (103) R. REPASKE, 1958. *Biochim. Biophys. Acta* 30, 225.
- (104) L.A. HEPPEL, 1971, en *Structure and Fuction of Biological Membranes*, Ed. L.I. Rothfield, pag. 38, Academic Press, New York.
- (105) I. NISONSON, M. TANNENBAUM, H.C. NEU, 1969. *J. Bacteriol.* 93, 1360.
- (106) L. LEIVE, V.K. SHOVLIN, S.W. MORGENLAGEN, 1968. *J. Biol. Chem.* 243, 6384.
- (107) E.H. COTA ROBLES, A.G. MANN, E.H. NILSON, 1958. *J. Bacteriol.* 75, 243.
- (108) P.D. BRAGG, C. HOU, 1971. *FEBS Lett.* 15, 142.
- (109) P.D. BRAGG, C. HOU, 1972. *Biochim. Biophys. Acta* 274, 478.
- (110) R. SCHARFF, R.W. HENDLER, N. NANNINGA, A.H. BURGESS, 1972. *J. Cell Biol.* 53, 1.
- (111) A.T. GANESAN, 1968. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 45.
- (112) R.M. BELL, R.D. MAVIS, M.J. OSBORN, P.R. VAGELOS, 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 628.
- (113) B.K. GHOSH, J.O. LAMPEN, C.C. REMSEN, 1969. *J. Bacteriol.* 100, 1002.
- (114) J. COLEY, M. DUCKWORTH, J.B. BADDILEY, 1972. *J. Gen. Microbiol.* 73, 587.
- (115) C. WEIBULL, 1953. *J. Bacteriol.* 66, 688.
- (116) J.M. BUYSEN, 1968. *Bacteriol. Rev.* 32, 425.
- (117) P.C. FITZ-JAMES, 1960. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 507.
- (118) N.S. GELMAN, M.A. LUKOYANOVA, 1962. *Microbiol.* 31, 453.
- (119) W. van ITERSOM, 1960, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 507.
- (120) G.B. CHAPMAN, J. HILLER, 1953. *J. Bacteriol.* 66, 362.
- (121) D.A. REAVELEY, 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 649.
- (122) D.J. ELLAR, D.G. LUNDGREN, R.A. SLEPECKY, 1967. *J. Bacteriol.* 94, 1189.
- (123) B.K. GHOSH, R.G.E. MURRAY, 1969. *J. Bacterio.* 97, 426.
- (124) V.M. REUCH, M.M. BURGER, 1973. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 79.

- (125) J. HOCHSTADT-OZER, 1972. J. Biol. Chem. 247, 2419.
- (126) J. HOCHSTADT-OZER, 1971. Fed. Proc. 30, 1062.
- (127) M.S. NACHBAR, M.R.J. SALTON, en Surface Chemistry of Biological Fluids, Ed. M. Blanck, 1970, pag. 175. Plenum Press New York.
- (128) N. NANNINGA, 1970. J. Cell Biol. 39, 251.
- (129) M.E. BOYER, C. REMSEN, 1970. J. Bacteriol. 101, 304.
- (130) D. SCHLESSINGER, V.T. MARCHESI, B.C.K. KWAN, 1965. J. Bacteriol. 90, 456.
- (131) D.M. ENGELMAN, J. Mol. Biol. 58, 153.
- (132) M.E. TOURTELLOTE, D. BRANTON, A. KEITH, 1970. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66, 909.
- (133) D.H. GREEN, M.R.J. SALTON, 1970. Biochim. Biophys. Acta 211, 139.
- (134) D. CHAPMAN, V.B. KAMAT, J. DeGIER, S.A. PENKETT, 1968. J. Mol. Biol. 31, 101.
- (135) D.F.H. WALLACH, P.H. ZAHLER, 1968. Biochim. Biophys. Acta, 150, 186.
- (136) M. ESFAHANI, A.R. LIMBRICK, S. KNUTTON, T. OCA, S.J. WAKIL, 1971. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 3180.
- (137) G.S.P. WILSON, C.F. FLOX, 1971. J. Mol. Biol. 55, 49.
- (138) M. KATES, 1964. Advan. Lipid. Res. 2, 421.
- (139) M.G. Mac-FARLANE, 1964. Advan. Lipid. Res. 2, 91.
- (140) M.R.J. SALTON, M.D. SCHMITT, 1967. Biochim. Biophys. Acta 135, 196.
- (141) M. SCHER, W.J. LENNARZ, C.C. SWEeley, 1968. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1313.
- (142) S. RAZIN, 1967, Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A. 143, 115.
- (143) H. GOLDFINE, 1968. Ann. Rev. Biochem. 37, 303.
- (144) D.E. BRUNDISH, N. SHAW, J. BADDILEY, 1966. Biochem. J. 99, 546.
- (145) C.H. MQLDOW, J. ROBERTSON, L. ROTHFIELD, 1972. J. Mol. Biol. 10, 137.
- (146) I. KAHANE, S. RAZIN, 1971. Biochim. Biophys. Acta 249, 159.
- (147) P.H. PATTERSON, W.J. LENNARZ, 1970. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 408.
- (148) M.R.J. SALTON, M.D. SCHMITT, P.E. TREFTS, 1967. Biochem. Biophys. Res. Commun, 29, 728.
- (149) M.J. OSBORN, J.E. GANDER, E. PARISI, J. CARSON, 1972. J. Biol. Chem. 247, 3962.
- (150) J.K. LANYI, 1971. J. Biol. Chem. 246, 4552.
- (151) E. MUÑOZ, J.H. FREER, D.J. ELLAR, M.R.J. SALTON, 1968. Biochim. Biophys. Acta 150, 531.

- (152) E. MUÑOZ, M.S. NACHBAR, M.T. SCHOR, M.R.J. SALTON, 1968. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 539.
- (153) E. MUÑOZ, M.R.J. SALTON, H. Ng. T. SCHOR, 1969. *Europ. J. Biochem.* 7, 490.
- (154) D.J. ELLAR, E. MUÑOZ, M.R.J. SALTON, 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 225, 140.
- (155) Y. FUKUI, M.S. NACHBAR, m.r.j. salton, 1971. *J. Bacteriol.* 105, 86.
- (156) I. KAHANE, S. RAZIN, 1969. *J. Bacteriol.* 100, 187.
- (157) E.H. FREIMER, 1963. *J. Exp. Med.* 117, 377.
- (158) J.W. VENNES, P. GERHARDT, 1959. *J. Bacteriol.* 77, 581.
- (159) J. KREMBER, 1971. *Biochimie*, 53, 517.
- (160) E. CUNDLIFFE, 1970. *J. Mol. Biol.* 52, 467.
- (161) W.K. VAMBUTAS, M.R.S. SALTON, 1970. *Biochim. Biophys. Acta*, 203, 94.
- (162) N. SUEOKA, W.G. QUINN, 1968. Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 33, 695.
- (163) M.R.J. SALTON en F. Snell, J. Wolker, G.J. Iverson, J. Lam., *Physical Principles of Biological Membranes*, Gordon y Breach, Science Publishers, New York, pag. 259.
- (164) M.R.J. SALTON, J.H. FREER, 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 531.
- (165) M.G. MacFARLANE, 1961. *Biochem. J.* 80, 45P.
- (166) K.Y. SHO, M.R.J. SALTON, 1966. *Biochim. Biophys. Acta* 116, 73.
- (167) E. KODICEK. Recent Progress in Microbiology, Inter. 8th. Congress Microbiology, Montreal 1962, University of Toronto Press, Montreal 1965, pag. 23.
- (168) M.R.J. SALTON, A.F.M. EHTISHAM-UD-DIN. 1965. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 43, 255.
- (169) E. MUÑOZ, M.R.J. SALTON, D.J. ELLAR, 1970. en *Membranes Structure and Function*, FEBS Proc. of the 6th. Meeting, Ed. R. Villanueva, F. Ponz, Academic Press, London-New York, pag. 51.
- (170) M.R.J. SALTON, J.A. CHAPMAN, 1962. *J. Ultrastruct. Res.* 6, 489.
- (171) K. MCQUILLEN, 1955. *Biochim. Biophys. Acta* 17, 382.
- (172) P. MITCHELL, J. MOYLE, 1956. *J. Gen Microbiol.* 15, 512.
- (173) A.R. GILBY, A.V. FEW, K. MCQUILLEN, 1958. *Biochim. Biophys. Acta* 29, 21.
- (174) M. KAPLAN, R.S. CRIDDLE, 1971. *Physiol. Rev.* 51, 249.
- (175) J.N. DAVIDSON en *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 5th. ed. Methuen y Co. London. 1965.
- (176) D.M. NEVILLE, Jr. 1968. *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540.
- (177) K. SUZUKI, E.S. PODULOS, W.T. NORTON, 1967. *Biochim. Biophys. Acta* 144, 376.

- (178) J.R. HARRIS, 1968. Biochim. Biophys. Acta 150, 534.
- (179) A.H. MADDY, P.G. KELLY, FEBS Lett. 1970, 8, 341.
- (180) T.J. BUTLER, G.L. SMITH, E.A. GRULA, 1967. Cand. J. Microbiol. 13, 1471.
- (181) M.R.J. SALTON, 1967. Trans. N.Y. Acad. Sci. U.S.A. 29, 764.
- (182) J.A. REYNOLDS, C.H. TANFORD, 1970. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 1002.
- (183) B. JIRGENSOS, S. CAPETILLO, 1970. Biochim. Biophys. Acta 214, 1.
- (184) E.E. SHRIERE, R.A. ROBINSON, 1970. J. Biol. Chem. 245, 2432.
- (185) G.C. CHEESEMAN, J. JEFFCOAT, 1970. J. Dairy Res. 67, 245.
- (186) S. KATZ, M.E. SHAW, W. CHILLAG, J.E. MILLER, 1972. J. Biol. Chem. 247, 5228.
- (187) C.A. NELSON, 1971. J. Biol. Chem. 246, 3895.
- (188) K. SIMONS, A. HELENIUS, FEBS Lett. 1970, 7, 59.
- (189) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, 1951. J. Biol. Chem. 193, 265.
- (190) R.K. MORTON, en S.P. Colowick N.O. Kaplan Methods in Enzymology Vol. 1. pag. 25, Academic Press. New York.
- (191) J. FOLCH, M. LEES, 1951. J. Biol. Chem. 43, 807.
- (192) J. FOLCH, M. LEES, G.H.S. STANLEY, 1957. J. Biol. Chem. 44, 497.
- (193) J. FOLCH, I. ASCOLI, M. LEES, J.A. MEATH, F.N. LeBARON, 1951. J. Biol. Chem. 191, 833.
- (194) A.I. OPARIN, M.A. LUKOYANOVA, N.S. GELMAN, 1970. Monatshefte für Chemie, 102, 828.
- (195) J.A. COHEN, M.G.P. WARRINGA, 1953. Biochim. Biophys. Acta 10, 195.
- (196) M.C. OTEY, J.M. BIRNBAUM, J.P. GREENSTEIN, 1954. Arch. Biochem. Biophys. 49, 245.
- (197) D.E. GREEN, H.D. TISDALE, R.S. CRIDDLE, P.Y. CHEN, R.M. BOCK, 1961. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 109.
- (198) S. RAYMOND, L. WEINTRAUB, 1959. Science, 130, 711.
- (199) P. TIOLLAIS, F. GALIBERT, A. LEPETIT, M.A. AUGER, 1972. Biochimie. 54, 339.
- (200) G. ZWEIG, J.R. WHITAKER, en Paper Chromatography and Electrophoresis, Vol. 1. 1967, pag. 147. Academic Press New York, London.
- (201) R. DeWACHTER, W. FIERS, 1971, en Methods in Enzymology, Ed. L. Grossman, K. Moldave, Vol. XX, pag. 167. Academic Press, London, New York.
- (202) E. de VITO, J.A. SANTOME, 1966. Experientia, 22, 121.
- (203) J.W. KEYSER, 1964. Anal. Biochem. 9, 249.
- (204) J.T. CLARKE, 1964. Ann. M.Y. Acad. Sci. 121, Part 2428.

- (205) W.H. PRICE, H. HARRISON, S.H. FEREBEE, 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, Part 2, 460.
- (206) R.M. ZAHARIUS, R.E. ZELL, 1969. Ann. Biochem. 30, 148.
- (207) W.F. MCGUCKIN, B.F. MCKENZIE, 1958. Clin. Chem. 4, 476.
- (208) G.H. EATON, A.E. SELBY, A.W. WRIGHT, 1964. J. Biol. Chem. 236, 2001.
- (209) K. TAKAYAMA, D.H. MacLENNANN, A. TZAGOLOFF, C.D. STONER, 1966. Arch. Biochem. Biophys. 114, 223.
- (210) U. RINGBORG, E. EGYHAZI, B. DANEHOLT, B. LAMBERT, 1968. Nature, 220, 1037.
- (211) F. EGANAI, en Methods of Enzymology, Vol. XIII, Ed, S.P.
- (212) K.A. NARAYAN, F.A. KUMMEROW, 1966. Clin. Chem. Acta 13, 535.
- (213) O. SMITHIES, Advance, Protein Chem. Vol. 14, Ed. C.B. Anfinsen, Jr. M.L. Anson, K. Bailey, J.T. Edsall, Vol. 14, pag. 65, 1959, Academic Press, New York, London.
- (214) L. ORSTEN, 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321.
- (215) B.J. DAVIS, 1964. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404.
- (216) J.V. MAIZEL, Jr. 1966. Science, 151, 988.
- (217) E. VIÑUELAS, I.D. ALGRANATI, S. OCHOA, 1967. Eur. J. Biochem. 1, 3.
- (218) I.P. GRIFFITH, 1972. Biochem. J. 126, 553.
- (219) H. GLOSSMANN, F. LUTZ, 1970. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1583.
- (220) J. Sh. TUNG, C.A. KNIGHT, 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1117.
- (221) R.F. PETERSON, 1971. Agr. and Food Chem., 19, 596.
- (222) A.K. DUNKER, R.R. RUECKERT, 1969. J. Biol. Chem. 244, 5074.
- (223) K.H. KOLDEN, N.C.F. YIM, L.J. GRIGGS, J.W. WEISBACH, 1971. Biochemistry, 10, 3110.
- (224) J.P. SEGRET, R.J. JACKSON, E.P. ANDREWS, V.T. MARCHESI, 1971. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 390.
- (225) H. FURTHMAYR, R. TIMPL. 1971. Anal. Biochem. 41, 510.
- (226) R.L. KATZMAN, 1972. Biochem. Biophys. Acta 266, 269.
- (227) Sephadex Gel Filtration in Theory and Practice, 1966. Pharmacia Fine Chemicals, Inc.
- (228) W.F. BLATT, M.P. FEINBERG, H.P. HOPFENBERG, C.A. SARAVIS, 1965. Science, 150, 224.
- (229) M.C. PORTER. Biotechnol. and Bioenerg. Sympo. N 3, 1972, 115. Ed. J. Wiley & Sons., New York.
- (230) Biolon. Polyelectrolyte Complex Hydrogel Membranes. Amicon. Corp. Mass.

- (231) L. HOUGH, J.K.N. JONES, en Methods in Carbohydrate Chemistry 1962 Vol. I, pag. 24, Ed. M. L. WOLFROM, R.L. WHISTLER, J.N. Be MILLER, F. SHAFIZA deh, Academic Press, N.Y.
- (232) S.M. PARTRIDGE, 1949. Nature, 164, 745.
- (233) R. KLEVSTRAND, A. NORDAL, 1950. Acta Che, Scand. 4, 1320.
- (234) S.M. PARTRIDGE, 1948. Biochem. J. 42, 238.
- (235) P.D. BOYER, 1954. J. Amer. Chem. Soc. 76, 4331.
- (236) R. BENESCH, R.E. BENESCH, en Methods of Biochemical Analysis, Vol. I, pag. 43. Ed. D. GLICK, Interscience Pu. New York, 1954.
- (237) C.B. ANFINSEN, E. HABER, 1961. J. Biol. Chem. 236, 1361.
- (238) W.C. SCHNEIDER, 1945. J. Biol. Chem. 161, 293.
- (239) V. SCHMIDT, S.J. THANNHAUSER, 1945. J. Biol. Chem. 161, 83.
- (240) I. BERENBLUM, E. CHAIN, N.G. HEATLEY, 1939. Biochem. J. 33, 68.
- (241) W. MEJBAUM, 1939. Z. Physio. Chem. 258, 117.
- (242) W.C. HUTCHISON, E.D. DOWNIE, H.N. MUNRO, 1962. Biochem. Biophys. Acta, 55, 561.
- (243) S. SADRON, C. BECK, J.P. EBEL, 1961. Biochim. Biophys. Acta 80, 448.
- (244) M. OGUR, G. ROSEN, 1950. Arch. Biochem. Biophys. 25, 262.
- (245) Z. DISCHE, 1949. J. Biol. Chem. 181, 389.
- (246) F.B. SEIBERT, 1940. J. Biol. Chem. 133, 599.
- (247) P.S. CHEN? T.Y. TORIBARA, J. WARNER, 1956. Anal Chem. 28, 1756.
- (248) Z. DISCHE, L.B. SHETTES, M. OSNOS, 1949. Arch. Biochem. 22, 169.
- (249) B.G. WRIGHT, P.O. REBERS, 1972. Anal. Biochem. 49, 307.
- (250) M.R.J. SALTON, 1960. Biochim. Biophys. Acta 45, 364.
- (251) D.A.L. DAVIES, 1955. Biochem. J. 59, 1955.
- (252) Z. DISCHE, 1953. J. Biol. Chem. 204, 983.
- (253) M.J. OSBORN, 1963. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 49, 307.
- (254) N. SHARON, R.W. JEANLUZ, 1960. J. Biol. Chem. 235, 1.
- (255) M.B. LEES, S. PAXMAN, 1972. Anal. Biochem. 47, 184.
- (256) P.J. GEIGER, P. BESSMAN, 1972. Anal. Biochem. 49, 467.
- (257) A.P. NEURATH, 1966. Experientia, 22, 290.
- (258) B. GERHARDT, H. BEEVERS, 1968. Anal. Biochem. 24, 337.
- (259) M.K. ZISHKA, J.S. NISHIMURA, 1970. Anal. Biochem. 34, 1.
- (260) J. BONITATI, W.B. ELLIOT, P.G. MILES, 1969. Anal. Biochem. 31, 399.
- (261) C.H. LO, H. STELSON, 1972. Anal. Biochem. 45, 331.
- (262) C. HUGGINES, D.F. TAPLEY, E.V. JENSEN, 1959. Nature, 167, 592.

- (263) J.D. ROBINSON, 1966. *Nature*, 212, 199.
- (264) D.O. WOODWARD, K.D. MUNKRES, 1966. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55, 872.
- (265) R.B. TRIPLET, L. SUMMERS, D.E. ELLIS, K.L. CARRAWAY, 1972. *Biochim. Biophys. Acta* 266, 484.
- (266) H. HAMAGUCHI, H. CLEVE, 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 233, 320.
- (267) J.A. TANNER, D.H. BOXER, 1972. *Biochem. J.* 129, 333.
- (268) B.P. YU, E.J. MASORO, 1970. *Biochemistry*, 9, 2909.
- (269) D.E. GREEN, H.D. TISDALE, R.S. GRIDDLE, R.M. BOCK, 1961. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 5, 81.
- (270) E.D. KORN, T. OLIVECRONA, 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 90.
- (271) D. KAPLAN, 1970. *Biochim. Biophys. Acta* 211, 396.
- (272) J.B. WEISS, H. BOBINSKI, C.J. LOTE, 1971. *Nature, New Biology*, 234, 25.
- (273) A. ROTHSTEIN, 1971. *Exp. Eye Res.* 11, 329.
- (274) H. GLOSSMANN, D.M. NEVILLE, 1971. *J. Biol. Chem.* 246, 6339.
- (275) S.I. BULOVA, E.R. BURKA, 1970. *J. Biol. Chem.* 245, 4907.
- (276) T.F. CHUANG, F.L. CRANE, 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971, 42, 1076.
- (277) E.J. MASORO, B.P. YU, 1969. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34, 686.
- (278) T.L. STECK, 1972. *J. Mol. Biol.* 66, 295.
- (279) M. KOLTHOFF, M. MATSUOKA, B.H. TAN, W.S. SHORE, 1965. *Biochemistry*, 4, 2969.
- (280) M.J. FERNANDEZ DIEZ, D.T. OSUGA, R.E. FEENEY, 1964. *Archiv. of Biochem. Biophys.* 107, 449.
- (281) O. KIRSCHENBAUM, 1972. *Anal. Biochem.* 49, 248.
- (282) S. BLACKBURN, en *Aminoacid Determination*, 1968. Marcel Dekker, Inc. New York, pag. 127.
- (283) R. CECIL, J.R. MCPHEE, C.B. ANFENSEN, Jr, M.L. ANSON, K. BAILEY, J.T. EDSALL, en *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 14, Acad. Press, 1959, pag. 255.
- (284) R. CECIL, en H. NEURATH *The Proteins VIII*, Academic Press, 1963, pag. 379.
- (285) H.H. GUNDLACH, S. MORRE, W.H. STEIN, 1959. *J. Biol. Chem.* 234, 1761.
- (286) H.H. GUNDLACH, W.H. STEIN, W. MOORE, 1959. *J. Biol. Chem.* 234, 1754.
- (287) R.J. WINZLER, *Red Cell Membrane Structure and Function*, Ed. G.A. Mamienson, y T.J. Greenwalt, Lippincott, Phi. 1969, pag. 157.



- (288) G.V. TIKHONOVA, I.M. SIMAKOVA, M.A. LUKOYANOVA, S.D. TATYKOVA, K.N. MIKELSAAR, N.S. GERLMAN, 1970. *Biokhymia*, 35, 1123.
- (289) S. ISHIKAWA, A.L. LEHNINGER, 1962. *J. Biol. Chem.* 237, 2401.
- (290) D. MAZIA, A. RUBY, 1968. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 1005.
- (291) P.J. CURTIS, 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, 194, 513.
- (292) H.R. TRAYER, Y. NOZAKY, J.A. REYNOLDS y CH. TANFORD, 1971. *J. Biol. Chem.* 246, 4485.
- (293) R.K. SCOPES, L.F. PENNY, 1971. *Biochim. Biophys. Acta* 236, 409.
- (294) M. INOUE, 1971. *J. Biol. Chem.* 246, 1834.
- (295) J.P. SEFREST, R.L. JACKSON, E.P. ANDREWS, V. MARCHESI, 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 390.
- (296) V. SHAPOT, S.Y. DAVIDAVA, 1971. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* Editado por J.N. DAVIDSON y W.E. COHEN, Vol. 11, pag. 81.
- (297) M.D. YUDKIN, 1966. *Biochem. J.* 100, 1005.
- (298) A. ABRAM, L. NIELSEN, J. THAEMERT, 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, 80, 325.
- (299) L. NIELSEN, L. ABRAMS, 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 680.
- (300) M.R.J. SALTON, M.D. SCHMITT, 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 529.
- (301) K.L. CARRAWAY, A. LAM, D. KOBILKA, J. HUGGINS, 1972. *Anal. Biochem.* 45, 325.